

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



**RESPUESTA SUPEROVULATORIA Y CALIDAD EMBRIONARIA EN VACAS DE
CARNE Y LECHE UTILIZANDO UN NUEVO IMPLANTE DE PROGESTERONA
EN UN PROGRAMA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES**

TESIS
QUE PRESENTA

JOSÉ LUIS HERNÁNDEZ RIVAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila

Noviembre del 2009

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna
División de Ciencia Animal

Respuesta superovulatoria y calidad embrionaria en vacas de carne y leche
utilizando un nuevo implante de progesterona en un programa de transferencia de
embriones

Tesis

José Luis Hernández Rivas

Tesis elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada
como requisito parcial para obtener el grado de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Comité particular

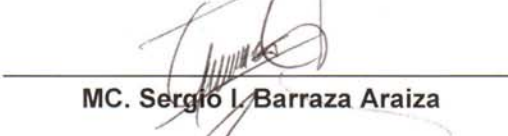
Presidente:


MC. Juan Luis Morales Cruz

Vocal:



Dr. Carlos Leyva Orasma


Vocal:


MC. Sergio I. Barraza Araiza

Vocal suplente:


MC. Jorge Iturbide Ramírez


MC. José Luis Francisco Sandoval Elías
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL


COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN
REGIONAL
CIENCIA ANIMAL

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Ma. Del Rosario Rivas Arredondo y Pedro Hernández Herrada.

Por haberme dado la oportunidad de realizar un sueño, que con su esfuerzo y dedicación lograron que terminara mis estudios. Que en lo largo de mi carrera conté con su apoyo incondicional, con sus consejos y lecciones me impulsaron para ser una persona de bien.

A MIS HERMANAS

Alma Delia Hernández Rivas y Miriam Alejandra Hernández Rivas

Por el apoyo brindado a lo largo de mi carrera, por que estuvieron en las buenas y malas en este caminar, ya que son muy importantes en mi vida y por ser las mejores hermanas del mundo. Las AMO.

A MIS ABUELOS

José Hernández lombardo, María Isabel Herrada medina, Enrique Rivas Sánchez y Paula Arredondo Rodríguez.

Por la confianza que depositaron en mi y el cariño que recibí de ustedes para realizar mi sueño.

A LAS FAMILIAS

HERNANDEZ HERRADA Y RIVAS ARREDONDO.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**: por haberme permitido llegar hasta estos momentos, por cuidarme y brindarme salud en toda mi vida y en especial esta etapa importante como lo fue el camino en la universidad. GRACIAS SEÑOR.

A mis padres ya que sin su apoyo no hubiera logrado lo que ahora soy, que a base de su esfuerzo y sacrificios lograron que tuviera lo mejor, gracias madre por darme la vida y cuidar de mi en todo momento, gracias padre porque con tus consejos logre y aprendí las verdades de la vida. Por su amor GRACIAS.

Gracias hermanas por sus consejos y por estar con migo en todo momento y aun ya mayores siguen siendo para mi, las "niñas".

Le doy gracias a mis tíos; Rivas Arredondo y Hernández Herrada. Porque de alguna u otra manera me ayudaron para realizar mis estudios. Muchas gracias a todos.

Gracias a UAAAN UL por darme la oportunidad de estar dentro de ella y lograr absorber los conocimientos que me brindaron, aun siendo de otro lugar me abrió sus puertas logrando ser parte de mi ALMA TERRA MATER.

Gracias a todos mis maestros por los conocimientos impartidos y la dedicación que tuvieron en mi formación, en especial a:

MC. Juan Luis Morales Cruz, maestro y asesor de tesis, gracias por haber tenido la oportunidad de conocerlo, por la dedicación y paciencia para haber realizado este trabajo. GRACIAS.

Dr. Carlos Leyva Orasma, gracias maestro por ayudarme en mi formación profesional, a base de su experiencia y sus conocimientos. GRACIAS.

Gracias a mis compañeros y amigos de grupo "G".

Marlen Vázquez Contreras, Elizabeth Téllez Tapia (Dora), Mayra Álvarez Duarte, Nadia Ivette Candela Medina, Anayanky Roblero Toledo, Corine Mendoza Santelices, Jesus contreras esquivel, Erick Jesús Juárez Ibarra (mi compadre), José Márquez Marrero, Oscar Loza García (Foco), Zaid Nafarrate Rivera, Alejandro Arenas, Darwin Escobar López, Rudy Alberto Barranco Barranco, Julio Nelson López Mendoza. Jorge Alberto flores cedillo y Emanuel Borrallas.

Por todas las experiencias buenas y malas que vivimos durante la carrera, que estoy seguro que nunca olvidaremos, por brindarme su amistad que seguirá a lo largo de nuestras vidas, muchas gracias.

Le doy gracias a una persona muy especial en mi vida, que fue parte fundamental de este éxito, y que a lo largo de la carrera estuvo con migo brindándome su apoyo incondicional. Gracias por tú AMOR y cariño **NEREIDA ANGULO RIOS**.

AL LIC. MARIO HUMBERTO FLORES MÁRQUEZ.

Por brindarnos su confianza y darnos la oportunidad y las facilidades para realizar este trabajo de investigación en su rancho.

AL LABORATORIO **BIOGÉNESIS BÁGO**.

Gracia Por su aporte económico en la realización y elaboración de este trabajo.

Gracias a M.V.Z Jorge López Torres por haberme ayudado en mi formación profesional, gracias por sus lecciones y consejos.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un nuevo implante de progesterona (Terapress) en la respuesta superovulatoria y calidad embrionaria en ganado lechero y de carne. La investigación fue realizada en 2 diferentes explotaciones. En ganado lechero (Holstein Friesian), utilizando 2 animales como donadoras, de 60 – 90 días post-parto. Para la investigación en ganado de carne se utilizaron 4 animales como donadoras (3 vaquillas y 1 vaca Brangus). Donde parte de la sincronización, en el protocolo de superovulación se inserto un dispositivo intravaginal liberador de progesterona en el día 6 del ciclo estral junto con una inyección intramuscular de benzoato de estradiol (1mg), el implante se retiro en el día 13 del ciclo, con una duración de 7 días en vagina. No se encontraron diferencias estadísticas en las variables analizadas, ($P>0.05$) para la respuesta superovulatoria (15.5 vs 10.0) y en calidad embrionaria ($P>0.05$), donde se evaluó por medio del porcentaje de embriones transferibles (100 vs 88.23%).

Sin embargo, se encontró diferencia estadística en el numero de cuerpos lúteos diagnosticados y el porcentaje de embriones recuperados (85 vs 9.67%).

Al evaluar el implante de progesterona (Terapress) en este estudio se puede concluir que el dispositivo logro que la respuesta superovulatoria fuera satisfactoria y una buena calidad de embriones trasferibles. Donde cabe señalar la importancia que tuvo el uso del implante en el protocolo de superestimulación del ganado.

Palabras clave: Superovulación, Calidad Embrionaria, Transferencia de Embriones, Ganado lechero y ganado de carne.

INDICE

Contenido	Página
RESUMEN.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo general.....	4
1.2 Hipótesis.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Dinámica folicular en la vaca.....	4
2.2 En qué consiste la superovulación.....	7
2.3 Cambios endocrinológicos durante la superovulación.....	10
2.4 Hormonas que se utilizan en un programa de T.E.....	13
2.4.1 FSH.....	13
2.4.2 LH.....	13
2.4.3 Progesterona.....	14

2.4.4 PGF2 Alfa.....	15
2.5 Técnicas de lavado uterino.....	15
2.6 Búsqueda y clasificación de los embriones.....	17
2.7 Preparación y transferencia del embrión.....	18
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Localización del área de estudio.....	20
3.2 Animales experimentales.....	21
3.3 Manejo y tratamiento de los animales.....	21
3.4 Detección de celos.....	22
3.5 Lavado uterino y clasificación embrionaria.....	23
3.6 Variables analizadas.....	23
3.7 Análisis estadístico.....	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
V. CONCLUSIÓN.....	32
VI. LITERATURA CITADA.....	33

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Página
Cuadro 1. Tratamiento de superovulación con dispositivos con progesterona en ganado lechero y de carne.....	9
Cuadro 2. Respuesta superovulatoria de las donadoras de carne y leche sincronizadas con un implante de progesterona (1 g).....	24
Cuadro 3. Relación entre el número de cuerpos lúteos diagnosticados y el porcentaje de embriones obtenidos en ambas categorías.....	24
Cuadro 4. Calidad y cantidad de embriones obtenidos en las donadoras de leche y carne sincronizadas con un implante de progesterona (1 g).....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Protocolo de tratamiento para superovulación.....	10
Figura 2. Método utilizado para cargar el embrión en una pajueta.....	19
Figura 3. Dispositivo Intravaginal liberador de progesterona (Terapress, 1 g).....	22

LISTA DE ABREVIATURAS

I.A: Inseminación Artificial

T.E: Transferencia de embriones

FSH: Hormona Folículo Estimulante

LH: Hormona luteinizante

mm: Milímetros

eCG: Gonadotropina Corionica Equina

hCG: Gonadotropina coriónica humana

FSH-p: Hormona Folículo Estimulante de origen porcino

UI: Unidades Internacionales

P4: Progesterona

EB: Benzoato de Estradiol

mg: Miligramos

mcg: Microgramos

IM: Intramuscular

C L: Cuerpo lúteo

PGF: Prostaglandina

GnRH: Hormona liberadora de Gonatropinas

ml: Mililitros

ng: Nano gramos

R.S.O: Respuesta superovulatoria

N. T: No transferible

Emb. Transf: Embriones transferibles

Emb. tot: Embriones totales

VE: Valerato de estradiol

ECP: Cipionato de estradiol

PMSG: Gonadotropina sérica de yegua preñada

anti-PMSG: Anticuerpos monoclonales contra PMSG

BST: Somatotropina bovina

I. INTRODUCCIÓN.

La ganadería bovina para la producción de carne y leche es de gran importancia socioeconómica para el país. Esto debido al gran impacto que tiene en la alimentación de la sociedad mexicana. Donde tanto la leche como la carne proporcionan vitaminas y proteínas de origen animal que requiere el organismo para lograr sus funciones vitales.

La producción de carne de bovino sigue siendo una de las actividades fundamentales del sector pecuario nacional, debido a su alta contribución en el valor de la producción con el 38.3% de carne en canal dentro de la oferta de carnes en el país, así como su alta participación en la balanza comercial agropecuaria, con la exportación de becerros (SAGARPA, 2006). La ganadería bovina para carne en el país se desarrolla en muy diversas condiciones agro-ecológicas, influenciadas principalmente por los factores climáticos. Esta variabilidad micro-climática no permite que la ganadería sea homogénea, igualmente la tecnología aplicada es muy variable, existiendo desde las explotaciones tradicionales hasta las que utilizan tecnología de vanguardia. Los principales sistemas de producción de ganado bovino de carne en México son: becerro al destete, pie de cría, engorda en corral, de doble propósito y engorda en pastoreo (cantú, 2004).

Los sistemas de producción lechera en el mundo varían desde los extensivos pastoriles hasta los intensivos estabulados, dependiendo del clima, la disponibilidad de los recursos naturales y la relación insumo-producto. Así, en regiones con buena relación costo-beneficio, la producción lechera se realiza en sistemas de estabulación total o semi-estabulado. Estos sistemas de producción de leche se encuentran en regiones de climas fríos y en algunas zonas de tipo desértico en Latinoamérica, como en el norte de México (Galina y Valencia, 2008).

Por lo anterior al hablar de la producción de carne y leche en el país, es importante revisar la problemática a la que se enfrentan los productores ganaderos, como lo es cumplir con los parámetros productivos en cada tipo de explotación.

La ganadería en México afronta bajo nivel de producción y productividad debido en parte, al rezago tecnológico que presenta comparada con la ganadería en los países desarrollados. Este rezago tecnológico obedece a un bajo nivel de adopción de tecnología por parte de los productores.

A pesar de que tanto la I.A como la T.E han demostrado gran utilidad en los programas de mejoramiento genético, el porcentaje de los bovinos incluidos en estas biotecnologías continúa siendo muy bajo en todos los países de Latinoamérica. En países como México, donde existen zonas especializadas en la producción de leche, el número de animales puede aumentar pero no será mayor de 50% del hato (Galina y Valencia, 2008).

Específicamente hablando de transferencia de embriones en ganado bovino la superovulación es un método que se ha utilizado en el ganado para aumentar el número de embriones. Donde la respuesta superovulatoria ha tenido resultados muy variables (Mapletoft *et al.*, 2002).

Además de los tratamientos superovulatorios tradicionales, existen otros en los cuales se utilizan progestágenos. Los progestágenos usados en combinación con las gonadotropinas, pueden inducir la ovulación en hembras anéstricas, o bien, sincronizar las ovulaciones en animales cíclicos, por lo que este principio fisiológico ha sido explotado de diferentes maneras para la inducción de la poli ovulación (Leyva *et al.*, 1999).

En cuanto la calidad embrionaria es importante mencionar que la determinación del grado de calidad del embrión permite caracterizar en términos cuantitativos las posibilidades de desarrollo y posterior nacimiento de ternero. Los diferentes grados de calidad son determinados por medio de la observación microscópica de la morfología. El éxito de la TE depende, entre otros factores, de una intensa experiencia en la evaluación y manipulación del embrión. Embriones clasificados como excelentes o buenos tienen una alta probabilidad de alcanzar la preñez. No obstante la correcta evaluación de los embriones obtenidos es importante tener en cuenta que existen casos en los cuales embriones calificados excelentes, luego de una perfecta transferencia no concluye en una preñez (palma, 1993). La calidad de los embriones es una de las variables que condicionan los resultados. Si se tiene control sobre la condición corporal y la sincronía de la receptora, por ejemplo con implantes de progesterona, una buena calificación de los embriones nos permitirá predecir el porcentaje de preñez a obtener con la transferencia. Se pueden obtener porcentajes de preñez de entre 40 y 60% con embriones frescos (Galina y Valencia 2008).

Por lo que durante más de 30 años, se han realizado estudios para evaluar diferentes tratamientos de progesterona / progestágenos para la sincronización del estro y superovulación. Los resultados muestran que los tratamientos de progesterona, si se les da el tiempo suficiente para permitir la intervención normal de regresión del CL provoca sincronización del estro y una buena respuesta superovulatoria (Bo *et al.*, 2002). En combinación con otras hormonas y en diferentes condiciones de manejo, genotipos y climas, el uso de progestágenos como agentes sincronizadores del estro ha demostrado ser una herramienta satisfactoria (Solórzano *et al.*, 2008).

Es por esto que se considera importante realizar estudios sobre el impacto del uso de biotecnologías como la I.A y la T.E en el ganado de carne en condiciones semiáridas y ganado lechero estabulado.

1.1 Objetivo General.

Evaluar el efecto de un nuevo implante (Terapress) de progesterona en el protocolo de superovulación y calidad embrionaria en ganado de carne y de leche.

1.2 Hipótesis.

El uso de progesterona (1 g) en un implante a base de silicona ofrece resultados similares a los protocolos tradicionales tratados sin implante en cuanto a respuesta superovulatoria y calidad embrionaria en ganado de carne y leche.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1.- Dinámica folicular en la vaca.

La dinámica folicular es la integración de las señales y factores extraovarios e intrafolicular que determinan si un folículo seguirá desarrollándose o se convertirá en atresico, como es el caso de la mayoría de los folículos en especies monovulatorias, como el ganado bovino (Webb *et al.*, 2003).

Las novillas tienen tres diferentes períodos de desarrollo de folículos dominantes durante un ciclo estral (estro, principios diestros y mediados de diestro), y que cada uno de los períodos de crecimiento del folículo dominante tiene tres distintas fases: Reclutamiento, selección, dominancia, atresia y la ovulación (Sunderlad *et al.*, 1994)

En el ciclo estral bovino normalmente comprende una o dos oleadas no ovulatorias y una oleada ovulatoria. El pico y la media de concentraciones en plasma de FSH e inhibina A son más bajos en las dos oleadas no ovulatorias que el tercera oleada ovulatoria. Las interacciones hormonales dentro de la oleada implican gonadotropinas pituitarias (Hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), y proteínas y péptidos de origen folicular (inhibina A follistatina) así como los esteroides ováricos de folículos (17β estradiol) o de origen luteal (progesterona), con prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF) de origen uterino que

tiene un papel fundamental dentro de la oleada ovulatoria. (Macmillan *et al.*, 2003). El aumento de la FSH alcanza un pico máximo cuando los folículos de la onda folicular reclutados son de 4.0 mm de diámetro (Ginther *et al.*, 2000).

El reclutamiento comienza cuando el folículo o folículos empiezan a madurar entorno a un suficiente estímulo pituitario (FSH), que permite el avance del folículo hacia la ovulación (Lucy, 2007). Durante el ciclo estral un aumento transitorio de la FSH circulante precede al reclutamiento de un grupo de folículos (Webb *et al.*, 2003).

El inicio del folículo primordial en crecimiento y las primeras etapas de foliculogénesis pueden ocurrir sin gonadotropinas. Sin embargo, estudios *in vivo* e *in vitro* indican que la FSH puede estimular la tasa de crecimiento del folículo preantral. El folículo antral en desarrollo de 4 mm de diámetro en el ganado vacuno, es dependiente de gonadotropinas (Webb *et al.*, 2003).

Según Padmanabhan y McNeilly (2001) la hormona folículo-estimulante (FSH) es un elemento clave en la regulación del desarrollo folicular. Bajas concentraciones de FSH a la hora de la desviación, es insuficiente para los folículos más pequeños, pero si es necesaria para el crecimiento continuo de los folículos más grandes.

La selección es el proceso por el cual, normalmente un solo folículo es elegido donde por si solo puede evitar la atresia y ser competente para lograr la ovulación (Lucy, 2007).

El mecanismo de selección del folículo ovulatorio parece estar relacionado con el registro de ARNm y expresión de codificación LHR 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) en células de la granulosa. Factores de crecimiento de producción local (la insulina), como factores de crecimiento (IGFs) y los miembros de la transformación del factor de crecimiento β (TGF β) y (inhibinas, activinas y proteínas morfogenética ósea (BMP), trabajan en conjunto con gonadotropinas a lo largo del crecimiento folicular continuo (Webb *et al.*, 2003).

La dominancia son los medios por los cuales el folículo seleccionado (dominante), mantiene su primacía sobre todos los demás folículos dictando el curso de los acontecimientos en el hipotálamo, pituitaria y ovarios (Lucy, 2007).

En los folículos maduros al continuar con su desarrollo, hay una transferencia de la dependencia de la FSH a LH, que pueden ser parte del mecanismo involucrado en la selección de los folículos de crecimiento continuo. La base hormonal aparente cambia, implica una disminución de las concentraciones de FSH sistémica por debajo de las concentraciones requeridas por los pequeños folículos. Además, a pesar de bajas concentraciones de FSH en cuenta para la regresión de los folículos más pequeños, no se sabe si el folículo dominante tiene una necesidad de mínimas concentraciones de FSH (Ginther *et al.*, 2000).

Se sabe que un folículo grande (≥ 10 mm) es activo en estrógenos, que está presente durante el estro y principios del diestro en vaquillas, donde el número de receptores de LH aumenta, mientras que el número de receptores de FSH disminuye. (Sunderlad *et al.* 1994). Los folículos grandes durante los primeros días de la onda folicular, en general, son derivados de los folículos que también se suman a la ola anterior. Una parte de estos folículos son cada vez más activos de estradiol y compiten por la dominancia (Hendriksen *et al.*, 2003).

Altas concentraciones de estradiol en el líquido folicular son el sello distintivo de los folículos dominantes y preovulatorio (Fortune *et al.*, 2006). Existen al menos dos períodos de cambios de folículos antrales que se producen durante el ciclo estral de los animales. Crece un folículo ovulatorio de tamaño ≥ 10 mm y se somete a la atresia durante la primera etapa de diestro (días 0-12) y otro folículo ovulatorio que crece el tamaño desde la luteólisis (día 18) hasta el estro (día 0) durante la fase folicular y ovular en el día 1 del ciclo (Sunderlad *et al.*, 1994).

Mediante la supresión por parte del folículo dominante y la influencia de estrógenos del mismo, empieza la regresión en unos pocos días antes de

ovulación de los folículos que no han sido destinados para ovular. Donde se convierten en atresicos y desaparecen (Lucy, 2007).

La dinámica de la onda folicular durante el ciclo estral en bovinos se ha traducido en una importancia relevante por las perspectivas de controlar con precisión la dinámica folicular y lútea, para finalmente controlar el momento de la ovulación y obtener una mayor eficiencia en el manejo reproductivo (Mapletoft *et al.*, 2002).

2.2.- En qué consiste la superovulación.

La Superovulación es la inducción de ovulaciones múltiples mediante el uso de gonadotropinas exógenas. La superovulación de vacas en programas de transferencia de embriones (T.E) se utiliza, en primer lugar, para la producción de la más alta calidad de ganado que tiene una influencia positiva en la producción y el nivel genético de poblaciones de todo el ganado (Zizlavsky *et al.*, 2002).

La inducción de la superovulación es un método ampliamente utilizado en la cría de ganado para aumentar el número de embriones. Sin embargo, todos los procedimientos disponibles, han tenido un rendimiento muy variable en el número de embriones transferibles (Loos *et al.*, 1990). El objetivo de los tratamientos superestimulatorios en vacas es la obtención de números máximos de embriones fertilizados y transferibles con una alta probabilidad de producir preñez (Mapletoft *et al.*, 2002).

La variabilidad en la respuesta superovulatoria continúa siendo uno de los problemas más frustrantes con la transferencia de embriones en el ganado bovino. En un estudio realizado donde se realizaron 2048 colecciones de embriones en donantes bovinas, se obtuvo un promedio 11.5 ovocitos/embriones y 6.2 embriones transferibles por vaca. Sin embargo, la variabilidad fue muy grande tanto en la respuesta superovulatoria, como la calidad de los embriones. 24% de las recolecciones no produjeron embriones viables; 64% de las donantes produjeron

menos embriones transferibles que el número promedio; 30% de las colecciones el 70% de los embriones.

El origen principal de la variabilidad en la respuesta superovulatoria en el ganado es el estado de los folículos ováricos en el momento en que se inicia el tratamiento de gonadotropinas.

Tres diferentes tipos de gonadotropinas se han utilizado para inducir la superovulación en la vaca; gonadotropinas a partir de extractos pituitarios de origen porcinos u otros animales domésticos, gonadotrofina coriónica equina (eCG) y gonadotropina coriónica humana (hCG). Los extractos de pituitaria son los más utilizados. Extractos que contienen altas cantidades de FSH y cantidades variables de LH, dependiendo del producto. La Prostaglandina (PG F2 Alfa) o sus análogos se han utilizado para la inducción de la luteólisis, en aspecto superstimulatorio para permitir el momento preciso del inicio del estro y de la ovulación (Mapletoft *et al.*, 2002).

El protocolo convencional para la superovulación fue originalmente basado en resultados obtenidos de experimentos donde la respuesta superovulatoria fue mayor en aquellos tratamientos que se iniciaron en los días 8 al 12 después del estro (Bo *et al.*, 2002).

Los tratamientos con FSH-p constan en dosis decrecientes durante 4 o 5 días, dos veces al día, de un extracto crudo pituitario (FSH-p). 48 o 72 horas después del inicio del tratamiento, se inyecta una prostaglandina para inducir luteólisis. El estro se produce entre 36 y 48 h, con la ovulación, 24 y 36 h después de iniciado el celo.

Gonadotropina coriónica equina es una glicoproteína con actividad de FSH y LH. Se ha demostrado que tienen una vida media de 40 h en la vaca y persiste hasta 10 días en la circulación de bovinos, por lo que normalmente se inyecta una vez seguido de una inyección de PGF, 48 horas más tarde. Las dosis

recomendadas de eCG van desde 1500 a 3000 UI, con 2500 UI por vía intramuscular elegido comúnmente (Mapletoft *et al.*, 2002).

2.2.1.- Ejemplos de tratamiento o protocolo de superovulación en bovinos Holstein y bovinos de carne.

Cuadro 1. Tratamiento de superovulación con dispositivos con P4 + (EB + P4). “Dosis de EB Y P4 vacas Holstein 2.5 mg EB y 100 mg P4; vacas productoras de carne 2.5 mg EB y 50 mg P4; vaquillonas 2.0 mg de EB Y 50 de P4.

Tratamiento		
Día 0	am	Inserción del dispositivo con P4+(EB)+P4°IM)
Día 4	am y pm	FSH IM
Día 5	am y pm	FSH IM
Día 6	am	FSH IM + PGF IM
	pm	FSH IM + retirar el dispositivo con P4
Día 7	am	FSH IM
	pm	FSH IM y observar celo
Día 8	am	Si hubo celo en el día 7 pm IA, si no hubo celo, observar celo
	pm	IA
Día 9	am	IA
Día 15	pm	Recolección de los embriones

(Adaptado de Galina y Valencia, 2006)

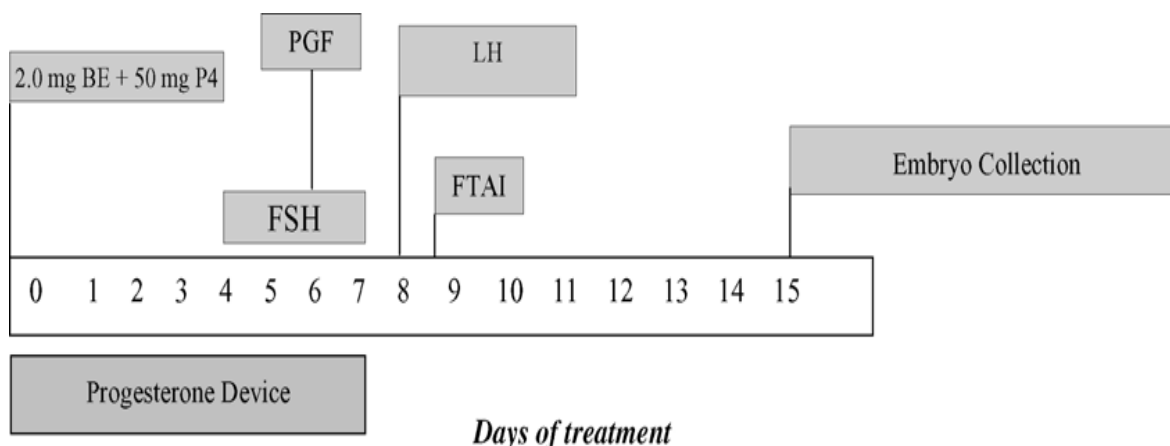


Figura 1. Protocolo de tratamiento para superestimulación, inducción de la ovulación, y la IA a tiempo fijo en vacas donantes Nelore. El tratamiento consiste en la inserción del dispositivo intravaginal liberador de progesterona y la administración de benzoato de estradiol (EB) y progesterona (P4) im en el Día 0. Los tratamientos de Superestimulación se inician el día 4, con administración de FSH dos veces al día durante 4 días. Las donantes reciben un tratamiento con prostaglandinas en la mañana del día 6 y el dispositivo de progesterona se retira. Las donantes también reciben LH-p en la mañana del día 8 y se inseminadas sin detección de celo 12 y 24 horas más tarde. Los embriones son recolectados el día 15 por el método no quirúrgico (Adaptado de Baruselli *et al.*, 2006).

2.3.- Cambios endocrinológicos durante la superovulación.

Como se menciono anteriormente diversas hormonas se han utilizado para lograr la superovulación. En la superovulación se han utilizando productos ya sea con gonadotropina corionica equina (eCG) o con hormona folículo-estimulante (FSH), donde todavía presenta una considerable variabilidad del número de embriones viables en la transferencia (Dieleman y Bevers, 1987).

El conjunto de folículos reclutados (con un diámetro de 4 a 5 mm) inician su crecimiento bajo la influencia de la FSH, siendo esta hormona la que regula en gran parte del proceso de reclutamiento y crecimiento de los folículos hasta los 7 a 9 mm de diámetro. La FSH es la más importante para la iniciación y el desarrollo inicial de los folículos antrales y la LH se vuelve más importante con el aumento

del desarrollo y la maduración de los folículos. Las etapas finales del desarrollo y maduración dependen de la frecuencia del pulso y aumento de LH. Las células de la granulosa contienen receptores de FSH y las células de la teca contienen receptores de LH durante las primeras etapas de desarrollo (Bao y Garverick, 1998).

Los folículos destinados a ovular o luteinizarse tienen, al momento del suministro de la gonadotropina, un tamaño aproximado de 3 a 4 mm de diámetro, por lo tanto, y para que estos alcancen un tamaño de 5 mm, es necesario esperar al menos 48 horas después de iniciado el tratamiento gonadotrópico (Leyva *et al.*, 1999).

Mediante la supresión por parte del folículo dominante y la influencia de estrógenos del mismo, empieza la regresión en unos pocos días antes de ovulación de los folículos que no han sido destinados para ovular. Donde se convierten en atresicos y desaparecen (Lucy, 2007).

Sin embargo los folículos subordinados pueden convertirse en folículos dominantes si a estos se les presenta FSH de manera exógena (es decir con tratamientos superestimuladores de FSH) (Mapletoft *et al.*, 2002). Donde las gonadotropinas exógenas quizás aceleren los procesos de maduración folicular, y de manera particular el desarrollo de receptores para la LH en las células de la granulosa (Leyva *et al.*, 1999).

El aumento de la FSH alcanza su máximo cuando los folículos de la onda folicular son de 4.0 mm de diámetro. La media de concentraciones de FSH es reducida más rápidamente con el aumento del número de folículos (Ginther *et al.*, 2000).

Cuando se administra un tratamiento con FSH de manera exógena iniciando en el momento de la aparición de la onda folicular, cerca de la hora prevista de la oleada provoca aumento de FSH, que tiene un efecto positivo sobre la respuesta superovulatoria (Nasser *et al.*, 1993).

La Superovulación con eCG induce una segunda ola de folículos después de la ovulación, causando altas concentraciones de estradiol en la sangre periférica durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Las capas de células de la granulosa de folículos antrales no están en contacto directo con los capilares, pero habitan en un microambiente del líquido folicular. El fluido folicular es similar al del plasma, y muchos de sus componentes se creen que se derivarán del plasma, mientras que otros compuestos, como esteroides y glicosaminoglicanos, parecen ser productos de la granulación de sus propias células. La producción de progesterona es reprimida por altos niveles de estradiol en el líquido folicular (Dieleman y Bevers, 1987).

Bouters *et al* (1983) indicaron que en un entorno altamente estrogénico afecta negativamente a principios del desarrollo del embrión (citados por Dieleman, 1987). Que parece ser debido a la larga vida media de eCG (alrededor de 5 a 7 días).

La administración de anticuerpo contra eCG (anticuerpos monoclonales contra eCG) para contrarrestar los efectos negativos de esta hormona por ejemplo a 60 horas después de la inyección de la prostaglandina, incrementa el número de embriones transferibles por lavado.

Por otro lado se sabe que la eCG sincroniza la maduración folicular acortando el periodo en el que tiene lugar ovulaciones múltiples. En general, la ovulación estimulada por la eCG parece ser retrasada por algunas horas en comparación normalmente con la ovulación en vacas con ciclo normal que se lleva a cabo en aproximadamente 24 horas después del pico preovulatorio de LH (Dieleman y Bevers, 1987).

2.4.- Hormonas que se utilizan en un programa de Transferencia de embriones.

2.4.1 FSH.

Los mecanismos que controlan la producción y liberación de FSH, es considerado útil para la naturaleza molecular de FSH que se produce en la glándula pituitaria y en circulación periférica. Es una Glicoproteína de 32000 daltons. La FSH es una glicoproteína compuesta por una hormona gonadotrofina alfa y un FSH β subunidad glicosilada.

La FSH posee una multitud de funciones reproductivas, como la maduración de los folículos, la prevención de la atresia folicular, la proliferación de células de la granulosa, la inducción de la aromatasa, y la inducción de receptores de LH y FSH en la hembra (Padmanabhan *et al.*, 2002).

Los receptores para la FSH se expresan en células de la granulosa desde las primeras etapas foliculares, y estudios *in vitro* han demostrado que la FSH acelera el crecimiento de los folículos preantrales (Galina y Valencia, 2008). La vida media biológica de la FSH en la vaca ha sido estimada en 5 horas, por lo cual dentro de un tratamiento superestimulador se aplica dos veces al día con intervalo de 12 horas (Mapletoft *et al.*, 2002).

2.4.2 LH.

La mayor secreción de LH se asocia con elevadas concentraciones de 17 β -estradiol en el ovario por el folículo dominante y el desarrollo normal del folículo más grande. Concentraciones elevadas de estradiol asociados con los folículos, son el resultado de aumento de la secreción pulsátil de LH (McDowell *et al.*, 1998).

La LH es una hormona glicoproteína de 30000 daltons. La LH posee una acción sobre la formación y el desarrollo del cuerpo lúteo, donde para la formación del C.L es esencial la formación de una red vascular. Los mediadores angiogenicos más importantes son el factor de crecimiento de los fibroblastos

(PGF), que estimulan la proliferación de las células endoteliales por la acción de la LH (Galina y Valencia, 2008). Los receptores para la LH se expresan en células de la teca desde las primeras etapas del desarrollo de los folículos (Bao y Garverick, 1998).

Los experimentos actuales en el ganado bovino mencionan la hipótesis, de que la LH manifiesta su efecto sobre el crecimiento del folículo más grande (7 a 9 mm) después del proceso de desviación folicular (Ginther *et al.*, 2001).

2.4.3 Progesterona.

La progesterona es producida principalmente por las células del cuerpo lúteo. Es un esteroide de 21 carbonos. Esta hormona actúa sinérgicamente con los estrógenos en varias funciones reproductivas que incluyen el crecimiento del epitelio glandular, del útero y de la glándula mamaria. La progesterona retroalimenta negativamente sobre la secreción de GnRH y gonadotropinas, inhibiendo el desarrollo folicular y la ovulación. Por esta razón, la progesterona y los progestágenos sintéticos son ampliamente utilizados para el control artificial de la reproducción (Galina y Valencia, 2008).

La administración de progestágenos a dosis normalmente utilizadas para sincronizar el estro en los resultados de ganado bovino existe una mayor frecuencia de pulsos de LH, que cuando un CL está presente en el ovario (McDowell *et al.*, 1998).

En la fase lútea los niveles de progesterona se han encontrado suficientes para suprimir la frecuencia de pulsos de LH, que a su vez provoca la supresión del crecimiento del folículo dominante (y en última instancia la regresión) y la aparición de una nueva onda folicular (Bo *et al.*, 2002).

Asimismo, Stock y Fortune (1993) demostró que la elevación de la progesterona sistémica con concentraciones de aproximadamente 2 a 5 ng / ml para 4 días dio como resultado la regresión de la mayoría, pero no todos, los folículos en las vaquillas (citados por McDowell *et al.*, 1998).

2.4.4 PGF2 Alfa.

Las prostaglandinas son derivadas del ácido araquidónico. Es un Ácido graso insaturado de 20 carbonos. La principal fuente de este ácido graso para la célula son los fosfolípidos de la membrana celular, que pueden ser liberados mediante la acción de una enzima fosfolipasa. El ácido araquidónico es entonces transformado mediante la acción de la ciclooxigenasa, para posteriormente ser transformada a diversas prostaglandinas específicas por otras enzimas (Galina y Valencia, 2008).

La prostaglandina F2 alfa es un agente luteolítico en el ganado y se ha utilizado ampliamente para sincronizar el estro. Donde causa regresión del cuerpo lúteo entre el día 5 al 16 después del estro. Sin embargo la falta de respuesta de luteolisis se debe principalmente a una deficiencia en el número o afinidad de los receptores en el cuerpo lúteo (Wiltbank *et al.*, 1995).

Resultados encontrados por Fuchs *et al* (1996) demostraron que la liberación de prostaglandinas es mediada por la oxitocina, donde la prostaglandina es responsable de la luteolisis durante el ciclo estral de vacas no preñadas.

2.5.- Técnicas de lavado uterino.

En la transferencia de embriones existen dos métodos de obtención de embriones; la técnica quirúrgica y la no quirúrgica. Donde la no quirúrgica es la más utilizada actualmente. La utilización del lavado uterino a través del cérvix para la obtención de los embriones en el bovino, ha sido un avance importante en la aplicación de esta tecnología (Leyva *et al.*, 1999).

Las técnicas de recolección de embriones consisten en el lavado interno de los cuernos uterinos. Siete días después de la IA de la donante, los embriones son recolectados con ayuda de un catéter que es introducido en el útero por la vagina y el cérvix. Los catéteres más usados son los Foley de dos o tres vías, cuyo

diámetro varían según la categoría de la donante ya sea vaca o novilla (Galina y Valencia 2008). Generalmente el catéter de dos vías se utiliza en novillas donadoras y la sonda telescópica de tres vías se utiliza fundamentalmente para vacas. En ambos catéter es adaptado, en su parte terminal, un balón elástico para aire, que puede ser sustituido en caso de ser dañado (Leyva *et al.*, 1999).

Los ovarios de las donantes deben ser palpados el día anterior al lavado o también puede ser el mismo día de la operación (o examinados por ultrasonografía) para estimar la respuesta al tratamiento superovulatorio (Galina y Valencia 2008). Una vez que la donante está en la trampa o chut se debe proceder a la anestesia epidural con anestesia local (procaína, lidocaína, xilacina, etc.), posteriormente la vulva y sus alrededores deben ser lavado con agua y jabón después de una solución antiséptica. Después que la anestesia epidural ha sido inyectada, la mano debe ser introducida por una sola vez de manera definitiva para el lavado. Cuando el catéter traspasa toda la longitud cervical, el operador lo guía hacia el cuerno que desea lavarse. La sonda debe colocarse lo más profundamente posible dentro del cerno uterino a unos 5 cm de la punta del cuerno, sobre todo en vaquillas. Para conseguir llevar la sonda hasta la parte más profunda del cuerno cuando se utilizan catéteres con mandriles metálicos centrales, es necesario que un ayudante retire una parte del mandril cuando este alcance la curvatura mayor del cuerno (Leyva *et al.*, 1999).

Este mismo autor menciona que una vez que el catéter se encuentre situado en el lugar deseado, se introduce aire con una jeringuilla graduada; la cantidad puede variar entre 12 y 20 cm³. El aire del balón cumple tres funciones; 1 fijar la sonda, 2 Impedir que el líquido refluya desde el lugar depositado, pudiendo salir al exterior a través del canal cervical y vagina y 3 mantener cerrada la punta del catéter.

Antes de elegir el catéter para el lavado, el medio para el mismo debe ser preparado. Se pueden utilizar una gran variedad de medios de recolección, pero el más popular actualmente es el Dulbecco's Buffer Salino (PBS), debido a que tiene

fosfato como buffer, y su pH cambia en forma mínima al ser expuesto a la atmosfera. Un medio de cultivo e embriones idea será aquel que se asemeje física y químicamente al medio un que se encontraban los embriones al momento de ser recolectados (Galina y Valencia 2008). Cualquiera que sea la cantidad del medio para el lavado que se emplee, debe contener 1% a 2% de suero fetal bovino o albumina el cual debe mantenerse congelado y descongelarse a temperatura ambiente cuando vaya a ser utilizado y añadirse antes de su uso. El volumen de medio para el lavado es de entre 300 y 500 ml por cada cuerno. Una vez realizado este procedimiento, es necesario lavar primero el cuerno con mejores pronósticos; es decir, donde se supone que existe la mayor cantidad de embriones de acuerdo con la cantidad de cuerpos lúteos presentes del ovario.

Los colectores pueden ser de diferentes tipos (probetas, frascos, conos de cristal), pero deben ser graduados para estimar la cantidad de líquido infundido y el recuperado. Además, tienen que estar bien protegidos del polvo y luz, y ser identificados con los siguientes datos: número de o nombre de la donante; cuerno al que pertenece el lavado; pronóstico (cantidad de cuerpos lúteos), y la hora en que se realiza el lavado y por último se procede a la búsqueda de los embriones.

Una vez concluido el lavado uterino, es recomendable administrar en el útero de la hembra algún tratamiento preventivo contra infecciones que puedan presentarse después de la operación. También en este momento debe aplicarse una dosis correspondiente de PGF la cual tendrá la función de lisar los cuerpos lúteos inducidos por la superovulación (Leyva *et al.*, 1999).

2.6.- Búsqueda y clasificación de los embriones.

Con la clasificación se pretende evaluar la calidad del embrión. Los embriones se clasifican basándose en sus características morfológicas.

Para la transferencia embrionaria los embriones se evalúan de acuerdo a las especificaciones de Linder y Wright (1983) citados por Morales (2001) en donde se descartan para la transferencia estructuras no aptas (por ejemplo:

ovocitos no fertilizados, embriones degenerados y con retraso en el desarrollo). Dentro de la clasificación, especifican que los embriones con grado 1 son aquellos que no poseen daños visibles, son simétricos, esféricos con células de tamaño, color y textura uniformes. Dentro del grado 2 son aquellos que se clasifican por poseer pequeñas imperfecciones, con blastómeros no alineados, forma irregular y/o pocas vesículas. Mientras que los clasificados en embriones de grado 3 están los que tienen problemas en su morfología como son células degeneradas de diferentes tamaños. Los no transferibles o de mala calidad presentan problemas severos, como tener un porcentaje de blastómeros no alineados, gran cantidad de células degeneradas de diferentes tamaños, vesículas grandes y numerosas, con o sin aspecto de masa embrionaria viable.

2.7.- Preparación y transferencia del embrión.

El método no quirúrgico de transferencia de embriones es usado con mucho éxito por la mayoría de los veterinarios. Casi todos utilizan pajuelas francesas de 0.25 ml, una pipeta descartable plástica con punta metálica y dos orificios hacia los costados (IMV, Francia), y una pistola para TE (IMV, Francia). También existen variantes, como pipetas metálicas (MINITUB, Alemania), que también poseen orificios de descarga hacia los costados (Galina y Valencia 2008).

La vaca receptora debe someterse a una palpación vía rectal, para determinar en qué ovario se encuentra el cuerpo lúteo, así como las características en cuanto al grado de desarrollo (Leyva *et al.*, 1999).

El embrión se coloca dentro de una pajuela esterilizada (0.25 ml) de la siguiente forma (figura 2): a) Aspiración de un pequeño volumen de medio de mantenimiento, b) Aspiración de una burbuja de aire, c) Aspiración de un pequeño volumen de medio de mantenimiento, d) Aspiración de una burbuja de aire, e) Aspiración del embrión con un pequeño volumen de medio de mantenimiento, f) Aspiración de una burbuja de aire, g) Aspiración de medio de mantenimiento, h) Aspiración de otra burbuja de aire, i) Aspiración de medio de cultivo hasta llenar la pajuela (Galina y Valencia 2008).

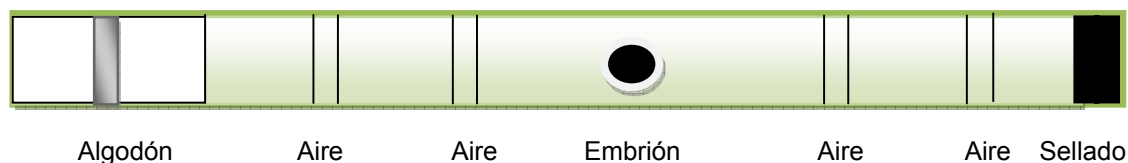


Figura 2. Método utilizado para cargar el embrión en una pajuela para su posterior transferencia en una receptora sincronizada.

La primera columna de medio humedece el algodón y el alcohol polivinílico del extremo cerrado de la pajuela; esto sella un lado y no permite la salida del embrión antes de ser transferido. La pajuela con el embrión se coloca dentro de la pistola de TE, y está dentro de la pipeta plástica (Galina y Valencia, 2008).

Ya decidida la embrionización en la receptora, debe aplicarse la anestesia epidural baja, con todas las reglas higiénicas recomendadas. El embrionizador debe preparar, si no lo ha hecho previamente, la pistola de Cassou con el embrión en su pajuela correspondiente, protegida por una funda de orificios laterales o centrales, para permitir la salida del medio con el embrión.

Al momento de introducir la pistola, los labios vulvares deben ser separados por un ayudante, mientras que el operador, con la mano correspondiente, traspasa la rima vulvar con cierta inclinación hacia arriba y luego recto. Con el cérvix fijo en la otra mano, se desplaza cranealmente, mientras busca el contacto de la punta de la pistola con la entrada del cuello.

Traspasando todo el canal cervical, la punta de la pistola debe inclinarse hacia al cuerno ipsilateral al lado del cuerpo lúteo, mientras se trata de levantar y estirar al cuerno, para tratar de depositar al embrión lo más profundamente posible, sin causar daños.

Una vez localizado el lugar apropiado, el depósito se realiza de manera muy suave, sin movimientos violentos. Al concluir la embrionización, la receptora es liberada y llevada a un lugar fresco, evitando movimientos excesivos, al menos las primeras 24 horas (Leyva *et al.*, 1999).

El porcentaje de preñez obtenido por el método no quirúrgico varía entre 40 y 65%, lo que depende de la calidad de los embriones transferidos, habilidad del operador, estado del CL, y de la condición corporal de las receptoras. Generalmente el porcentaje de preñez con embriones frescos es de 60%; y de 40 a 50% con embriones congelados (Galina y Valencia, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Localización del área de estudio.

Para la investigación en ganado de carne, se llevo a cabo en un rancho ganadero comercial ubicado en el municipio de Villa Hidalgo del estado de Durango localizado en el Km 253+800 de la carretera Durango-parral, situado en la latitud 25° 53' y 104° 53' de altitud, con 2000 metros sobre nivel del mar, siendo la temperatura máxima de 34° en los meses de mayo/junio y la mínima de -2° en el mes de enero; presentando una precipitación pluvial promedio anual de 450 m³. El rancho cuenta con una población total de 208 animales de la raza Angus y Brangus explotados en sistema extensivo, de los cuales 100 animales son vacas en producción, 20 novillas, 2 machos sementales, becerros machos 43 y becerros hembras 43.

El estudio en ganado de raza Holstein se realizó en un establo lechero de la Comarca Lagunera en la ciudad de Torreón Coahuila. El establo cuenta con una población total de 543 animales de los cuales 290 están en producción, 30 secas, 80 vaquillas en edad de inseminación, 40 vaquillas preñadas, 90 becerras de entre 2 y 12 meses, y una población lactante de 13 animales. El promedio de producción general del establo es de 25 litros.

3.2 Animales experimentales.

El estudio en ganado de carne se realizo de octubre a noviembre del 2008 utilizándose 4 animales como donadoras (3 vaquillas y 1 vaca Brangus), cuyas condiciones de peso corporal oscilaban entre los 400 a 450 kg, con buen estado de salud, las vacas fueron alimentadas en base a libre pastoreo teniendo como base a las siguientes variedades de zacate navajita (*Boutolea barbata*), y zacate avenilla (*Bouteloua Aristidiodes*).

Para la investigación en ganado lechero se utilizaron dos vacas Holstein-Friesian, de entre 60-90 días postparto, de entre dos y cuatro partos, con pesos corporales que oscilaron entre 600–700 kg, con una producción láctea y calidad genética similar y en buen estado de salud. Las vacas estaban alojadas en corrales de producción en donde se les da de comer a las 5 a.m., 8 a.m., 1 p.m. y 5 p.m. con una dieta con una proporción de forraje/concentrado de 49.0/51.0, respectivamente

3.3 Manejo y tratamiento de los animales.

La selección de las donadoras en ganado lechero fue basado en las características fenotípicas y en la producción de leche, el promedio de producción de los animales fue de 32 Kg/lactancia. A las donadoras se les practicó un examen ginecológico, mediante palpación rectal y los animales que presentaron trastornos reproductivos, no se incluyeron en el experimento, el examen se realizó a los 15, 30 y 60 días postparto, la sincronización para la superovulación se inició a los 60 días posparto. Las vacas fueron separadas del manejo rutinario reproductivo del establo y se sometieron a un proceso de superovulación.

La selección de las donadoras en ganado de carne se baso en el registro genealógico y se les realizo un examen ginecológico descartándola presencia de patologías las donadoras fueron separadas del manejo reproductivo del rancho y también se sometieron a un proceso controlado de superovulación.

El protocolo utilizado para la sincronización y tratamiento superovulatorio fue el mismo en los dos grupos (ganado lechero y carne). Las hembras fueron presincronizadas usando dos aplicaciones de Pg f2alfa (Cloprostenol sódico, CRONIBEN®) en dosis de 500 mcg con intervalo de 14 días entre inyecciones. La detección de estro se realizó después de la segunda inyección tomando el día del celo como día cero del ciclo. El día 6 del ciclo estral se les aplicó a ambas donadoras un implante intravaginal de progesterona (figura 3, Terapress 1g) y una inyección intramuscular de benzoato de estradiol (BIOESTROGEN®, 1mg). El tratamiento superovulatorio se inició el día 11 del ciclo estral administrando dos dosis por día de FSH-P a las 7 am y 7 pm respectivamente y finalizó el día 14 (4 días de tratamiento superovulatorio) aplicando una dosis total recomendable para ganado de carne de 600 UI y para ganado lechero 900 UI. El día 13 del ciclo estral o tercer día de tratamiento superovulatorio se retiró el implante de progesterona a las 7 pm acompañado de una tercera dosis de prostaglandina aunado al tratamiento de FSH.



Figura 3. Dispositivo intravaginal liberador de progesterona (Terapress, 1 g)

3.4 Detección de celos.

La detección de celo se realizó a partir del día 14 y las donadoras fueron inseminadas 12 horas y reinseminadas a las 24 horas posteriores al reporte de celo, inseminando a ambas donadoras con toros de registro de la misma raza de fertilidad probada.

3.5 Lavado uterino y clasificación embrionaria.

El lavado para la recuperación de los embriones se realizó al séptimo día posterior a la primera inseminación por el método no quirúrgico, utilizando 500 ml de solución de lavado (BioLife Advantage Embryo Collection Medium) por cuerno. Para la transferencia embrionaria los embriones se evaluaron de acuerdo a las especificaciones del Linder y Wrigth (1983), descartándose estructuras no aptas (ovocitos no fertilizados, embriones degenerados y con retraso en el desarrollo). Embriones en estado de mórula, blastocito, temprano y expandidos son clasificados y preparados en solución de mantenimiento para su transferencia en fresco, además de ser envasados en pajillas de 0.25ml.

3.6 Variables analizadas.

- Respuesta superovulatoria en ganado lechero y de carne.
- Porcentaje de recuperación embrionaria.
- Cantidad y calidad embrionaria en ganado lechero y de carne.

3.7 Análisis estadístico.

El análisis estudiado se realizó con el software SYSTAT 10 de la siguiente forma; para la respuesta superovulatoria se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y para las variables con proporción se utilizó una prueba de J_i^2 .

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Cuadro 2. Respuesta superovulatoria de las donadoras de carne y leche sincronizadas con un implante de progesterona (1 g).

	n	R.S.O (CL)	\bar{X}
Ganado de carne	4	62	15.5 a
Ganado lechero	2	20	10.0 a

Literales iguales entre columnas no difieren estadísticamente ($P>0.05$).

R.S.O= Respuesta superovulatoria

C.L= Cuerpos Lúteos

n= Numero de animales

En el cuadro 2, se observa una diferencia en la respuesta superovulatoria, siendo en ganado de carne donde se obtuvieron mayor cantidad de cuerpos lúteos comparado con el ganado lechero. Pero no existe diferencia estadística entre los dos grupos.

Cuadro 3. Relación entre el número de cuerpos lúteos diagnosticados y el porcentaje de embriones obtenidos en ambas categorías.

	R.S.O (CL)	Emb. Obt.	%
Ganado de carne	62	6	9.67% a
Ganado lechero	20	17	85% b

Literales diferentes entre columnas difieren estadísticamente ($P<0.05$).

R.S.O= Respuesta superovulatoria

C.L= Cuerpos Lúteos

Emb. Obt= Embriones obtenidos

En el porcentaje de embriones obtenidos se puede observar una diferencia estadística, donde en ganado de leche fue mayor. Siendo que en ganado de carne solo se recolectaron un 9.67% en relación a los CL diagnosticados.

Cuadro 4. Calidad y cantidad de embriones obtenidos en las donadoras de leche y carne sincronizadas con un implante de progesterona (1 g).

	Emb. Tot	Emb. Transf (%)	Embriones N. T. (%)
Ganado de carne	6	6 (100%) a	0(0%) a
Ganado lechero	17	15 (88.23%) a	2 (11.76%) a

Literales iguales entre columnas no difieren estadísticamente ($P>0.05$).

N. T.= No transferible

Emb. Transf= Embriones transferibles

Emb. tot.= Embriones totales

El porcentaje de los embriones transferibles (cuadro 4) al evaluarlos, no se observó diferencias estadísticas. Sólo para en los embriones de ganado lechero se encontraron 11.76% no transferibles sin haber diferencia.

En cuanto a la respuesta superovulatoria se puede observar que existe buena respuesta tanto en ganado de carne como de leche, ya que a nivel mundial reportan una media de 7-8 C.L por lavado (Lindsell, *et al* 1985; Larocca, *et al* 1995; Goulding, *et al* 1996 y Baruselli, *et al* 2006). Sin embargo unas vacas respondieron mucho más que otras, esto puede ser debido a la respuesta individual de cada animal, de acuerdo con Murphy *et al* (1984). En este caso la mayoría de las donantes de raza de carne tuvieron mejor respuesta que las donantes lecheras.

En esta investigación se utilizaron animales de diferentes razas (Holstein y Brangus), donde la raza de acuerdo con palma (1993) tiene un papel muy importante en la variabilidad en la respuesta superovulatoria, esta mismo autor menciona que se han hecho numerosos estudios para establecer relaciones FSH/LH optimas para la superovulación de hembras de razas distintas, productoras de carne o leche, donde se observo que las donantes de razas lecheras son más sensibles que las productoras de carne a cantidades excesivas en la preparación hormonal. Lo que podría provocar una sobrestimulación ovárica en donantes lecheras o una retroalimentación negativa. Posiblemente debido a

esta situación los resultados se hayan encontrado mayor respuesta superovulatoria en el ganado de carne.

Mapletoft *et al* (2002) mencionan que las fuentes más importantes de la variabilidad en la superovulación pueden ser relacionados con los tratamientos hormonales , tales como la preparación de gonadotropina, lote, dosis total, la duración, calendario de tratamiento y el uso de hormonas adicionales, tratamientos con estradiol y progesterona, que han reducido la variabilidad causada por el tratamiento de las vacas, en las diferentes etapas del desarrollo folicular y al mismo tiempo, mejora la respuesta superovulatoria y la sincronización de estro, por otro lado, la variabilidad inherente al animal y a su entorno. Estos factores pueden incluir el estado de nutrición, salud reproductiva, historia reproductiva, la edad, la estación del año, la raza, estado del ovario en el momento del tratamiento y repetición de tratamientos superovulatorios.

En este estudio el uso del implante intravaginal liberador de progesterona, dio un efecto positivo en la respuesta superovulatoria, ya que este dispositivo logra una buena sincronización del estro en las donantes, por lo que aunado al tratamiento superovulatorio con gonadotropinas se puede lograr que un número mayor de folículos logren ovular. Aunque no se midieron los niveles de progesterona en sangre se sabe que el dispositivo libera durante su permanencia >1 ng/ml de progesterona lo cual permitió la correcta sincronización (Wakuma *et al.*, 2008).

Mapletoft *et al* (2002) reportaron un experimento en ganado de carne donde fueron sometidas a tratamiento superovulatorio con cantidades variables en cuanto a la relación FSH-LH, Los resultados demuestran que preparados de con mayor porcentaje de FSH afecta la cantidad de embriones transferibles pero mejora la respuesta superovulatoria. En donde encontraron una mayor respuesta superovulatoria en aquellas donantes que se le suministro cantidades menores de LH y una menor respuesta en las que se les aplico mayor cantidad de LH. Se obtuvieron 10.2 CL vs 17.2 CL con una mayor concentración de FSH. Por el

contrario en los experimentos realizados por Kanitz *et al* (2002) encontraron que FSH a altas dosis pueden perturbar el proceso de ovulación en dos niveles, a nivel de hipófisis y a nivel de ovario. Otra razón que encontró este mismo autor que, explica la reducción del número de ovulaciones puede consistir en la baja regulación de receptores de FSH en el ovario por altas dosis de esta hormona.

Cushman *et al* (1999), en sus estudios concluyeron que la respuesta superovulatoria en vacas productoras de carne no lactantes, está relacionada con la presencia de los folículos primordiales y el número de folículos en crecimiento posiblemente en el momento de la superovulación. Lo cual indica que es de suma importancia el momento de iniciado el tratamiento superovulatorio.

Coincidiendo con Bergfelt *et al* (1997) donde sugieren que el tiempo óptimo para realizar la superovulación debe iniciarse en el momento de la aparición de la oleada folicular, que es entre el día 8 a 12 después del estro. Del mismo modo Naseer *et al* (1993) coincide con este autor y además confirma que si el tratamiento con gonadotropinas se inicia un día después en que se presente la oleada folicular la respuesta superovulatoria se reduce considerablemente.

Cabe señalar que se cuidó que los tratamientos se iniciaran el día 11 del ciclo estral, previendo una posible variabilidad en la respuesta superovulatoria, como lo mencionan los autores anteriores. Por otro lado Guilbault *et al* (1991) obtuvo resultados que muestran claramente que cuando la superovulación se inició en ausencia de un folículo dominante, la tasa de ovulación de las novillas es mayor, y sobre todo, menos variable que en los que había un folículo dominante.

Se han realizado estudios de diferentes esteres en combinación con implantes con progesterona como; benzoato de estradiol (BE), Valerato de estradiol (VE) y Cipionato de estradiol (ECP), donde según Baruselli *et al* (2006), Estos diferentes esteres detienen el desarrollo y maduración del folículo cuando se encuentran concentraciones elevadas de progesterona. Donde en tanto el EV,

como ECP poseen una larga vida media, lo que resulta un retraso e intervalos más variables en la aparición de onda folicular, a diferencia de 17-β estradiol y BE que es más corta.

Bo *et al* (2002) encontró que existe una menor sincronía en la aparición de la onda folicular y una menor respuesta superovulatoria en un tratamiento con 5 mg de Valerato de estradiol y 3 mg de norgestomet que con 5 mg 17-β estradiol y 100 mg de progesterona en vacas con el implante. Coincidiendo con Colazo *et al* (2005) donde el VE afectó el tamaño preovulatorio del folículo dominante después de la retirada del implante de P4, por lo que también afectó la respuesta superovulatoria en vacas Holstein (11.3 vs 8.3).

Otro estudio realizado por Son *et al* (2007) en protocolo de superovulación donde utilizó un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR) y 1 mg de BE encontraron una media de 7.9 CL, donde comparado con los resultados de nuestro estudio demuestra una diferencia favorable en el número de CL (10.0 vs 7.9).

Al analizar los resultados obtenidos en cuanto a la cantidad de cuerpos lúteos diagnosticados y el número de embriones obtenidos, si existió diferencia en ganado de carne ya que solo se obtuvo un 9.67% de embriones en relación a los cuerpos lúteos diagnosticados. Esto puede deberse al factor de la edad ya que en ganado de carne se utilizó un 75% de donadoras que fueron vaquillas, donde según Palma (1993) cuando animales jóvenes son tratados con dosis elevadas de gonadotropinas se produce una sobrestimulación ovárica donde muchos folículos comienzan a desarrollar pero pocos son capaces de ovular y la mayoría sufre luteinización o se atresian. También se puede considerar importante la presencia de obstrucciones no detectadas en el examen ginecológico como posible causa de una baja obtención de embriones. Además si existe una asincronía al momento de la superovulación en el reclutamiento puede haber mayor variabilidad en la respuesta folicular, cantidad y calidad de embriones colectados (Mapletoft *et al.*, 2002). Sin embargo esto sucedió solo en el caso de ganado de carne.

También palma (1993) menciona que al aumentar la edad de la donante disminuyen el número de ovulaciones, la tasa de fertilización y calidad embrionaria, por lo que para lograr un alto número de embriones transferible, la dosis de gonatropinas debe ajustarse a la edad de la donante.

En los animales sobrestimulados, generalmente se obtienen una menor tasa de recolección de ovocitos y embriones (palma 1993) a esto se le han adjudicado varias razones; una de ellas según Monnlaux *et al* (1983) es la retención de ovocitos en los folículos luteinizados y en los CL, también Mc Gowan *et al* (1985) encontró como otra posible causa a la baja obtención de embriones la retención de ovocitos y embriones en los oviductos. Lo que ocasionaría que al momento del lavado no se obtengan embriones independientemente de la capacidad técnica del personal a cargo de programa. Revisando estos estudios se les puede tomar en cuenta para una respuesta a lo que pudo haber ocurrido en el caso de las vaquillas en donde no se recolectaron embriones.

Para evaluar la calidad de los embriones para este trabajo, se consideró dividir a los embriones en transferibles y no transferibles, no encontrando diferencia estadística. El porcentaje de los embriones transferibles en este estudio se considera alta, ya que en el caso de ganado de carne se obtuvo un 100% y 88.23% en ganado lechero. En cuanto a los embriones no transferibles se encontraron 2 (11.76%) en ganado lechero y ninguno en ganado de carne. Coincidiendo con Bo *et al* (2002) en un estudio comparando respuesta superovulatoria y calidad embrionaria en ganado lechero y de carne utilizando un dispositivo de progesterona, donde tampoco obtuvieron diferencia estadística en embriones trasferibles (6.6 vs 5.1). En cambio comparando resultados con Mapletoft, *et al* (2002) en ganado de carne, los resultados obtenidos en este estudio fueron mayores en cuanto embriones transferibles (100 vs 61%).

En cuanto a la variabilidad de obtención de embriones y calidad de los mismos, existen varios aspectos importantes que revisar, donde Greve *et al* (1995) mencionan que las vacas donantes que reciben un tratamiento superovulatorio

con eCG o FSH y se les realiza un lavado con la técnica no quirúrgica entre el día 6 a 8 después de la inseminación, el 15 al 20% no dan embriones.

En un trabajo realizado por Leroy *et al* (2005) comparando resultados en cuanto a la calidad del embrión en vacas y vaquillas lecheras, y en vacas de carne, encontraron en vacas Holstein Friesian lactantes un 13,1% fueron embriones excelentes y en vacas Belgian Blue un 55% de embriones excelentes. Coincidiendo con lo encontrado en este estudio, donde se obtuvieron mejores resultados en ganado de carne.

En un estudio realizado por Dieleman y Bevers (1987) con PMSG encontraron que la calidad embrionaria se ve afectada negativamente por la administración en el tratamiento superovulatorio, donde esto puede ser debido a la larga vida media en sangre de esta hormona. Sin embargo Morales (2001) al utilizar vía aorta abdominal no encontró diferencias entre los tratamientos con eCG y FSH-P. Nakajima *et al* (1992) concluye que el uso de anti-PMSG seguida de dos aplicaciones de PGF2 alfa en vacas tratadas a las 12 horas después del comienzo del estro mejora la calidad de embriones recuperados, probablemente debido a la inhibición del medio ambiente estrogénico elevado después de la ovulación.

Atkins *et al* (2009) encontraron que el tamaño del folículo en el día de la IA se correlacionó positivamente con la P4 y el volumen del CL siete días después de la IA. Cuando se analizaron los embriones, donde tanto el tamaño del folículo, el volumen CL funcional, y la P4 no afectó el desarrollo del embrión. Pero el tamaño del folículo creciente tendía a aumentar la calidad del embrión. También confirmaron que en ese estudio hubo una tendencia a mejorar la calidad de los embriones recuperados de vacas con más folículos. Moreira *et al* (2002) demostraron que con la administración de somatotropina bovina (BST) en IA disminuye el número de óvulos no fertilizados, y aumenta el porcentaje de embriones transferibles.

Un aspecto importante en la disminución de la eficiencia reproductiva es el estrés calórico ya que vacas bajo estrés por calor se ha disminuido la duración e intensidad del estro, alterando el desarrollo folicular y embrionario (Wilson *et al* 1998; Wolfenson *et al* 2000; Jordan, 2003 y Roth, 2008). Por esto la producción de embriones por superovulación se reduce a menudo en los períodos de estrés por calor. La reducción asociada en el número de embriones transferibles se debe a la viabilidad embrionaria reducida, menor tasa de fertilización, y la reducción de la calidad del embrión (Putney, *et al* 1989 y Hansen *et al* 2001).

V. CONCLUSIONES.

Al evaluar el implante de progesterona (Terapress) en este estudio, se puede concluir que el dispositivo logro una buena respuesta superovulatoria y una buena calidad de embriones transferibles. Donde cabe señalar la importancia que tiene el uso de dispositivos intravaginales liberadores de progesterona en protocolos de superovulación del ganado.

VI. LITERATURA CITADA.

Atkins, J.A., Smith, M.F., MacNeil, M.D., Geary, T.W. (2009). Determinants of embryo development and quality in beef cattle: Effect of pre-ovulatory follicle size, CL volume, and serum concentrations of progesterone. *Biology of Reproduction*. 81:505.

Bao, B., Y Garverick, H.A. (1998). Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci*. 76:1903-1921.

Baruselli, P.S., Filho, M.F., Martins, C.M., Nasser, L.F., Nogueira, M.F., Barros, C.M y Bo, G.A. (2006). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 65:77–88.

Bo, G.A., Baruselli, P.S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R., Tribulo, H y Mappletoft, R.J.(2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57:53-72.

Bergfelt, D.R., Bó, G.A., Mappletoft, R.J., Adams, G.P. (1997). Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Anim Reprod Sci* 49:1-12.

Cantú, J.E. (2006). Sistemas de producción de ganado bovino productor de carne. UAAAN cuarta edición Torreón Coahuila México.

Colazo, M.G., Martínez, M.F., Small, J.A., Kastelic, J.P., Burnley, C.A., Ward, D.R y Mappletoft, R.J.(2005). Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. *Theriogenology*; 63:1454-1468.

Cushman, R.A., DeSouza, J.C., Hedgpeth, V.S y Britt, J.H. (1999). Superovulatory Response of One Ovary Is Related to the Micro- and Macroscopic Population of

Follicles in the Contralateral Ovary of the Cow. *Biology of Reproduction* 60, 349–354.

Dieleman, S.J y Bevers, M.M. (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. Repaired. Fertil.* 81:533-542

Fortune, J.E., Rivera, G.M., Yang. (2004). Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science.* 82-83:109-26.

Fuchs, A.R., Rollyson, M.K., Meyer, M., Fields, M.J., Minix J.M., y Randel, R.D. (1996). Oxytocin Induces Prostaglandin F₂. Release in Pregnant Cows: Influence of Gestational Age and Oxytocin Receptor Concentrations. *Biology Of Reproduction.* 54, 647-653.

Galina, Carlos y Valencia, Javier. (2008). *Reproducción de los animales domésticos*, 3ª. Edición –México: Limusa.

Ginther, O.J., Bergflet, D.R., Kulick, L.J., y Kot, K. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle: Role of two-way functional coupling between follicle-stimulating Hormone and the follicles. *Etology of Reproduction* 62,920-927.

Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Beg, M.A., y Kot, K. (2001). Follicle Selection in Cattle: Role of Luteinizing Hormone. *Biology of Reproduction* 64, 197–205.

Goulding, D., Williams D.H., Roche J.F y Boland M.P. (1996). Factors affecting superovulation in heifers treated with PMSG. *Theriogenology* 45:765-773.

Greve, T., Callesen H., Hyttel, P., Hoier , R y Assey, R. (1995). The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology.* 43;41-50.

Guilbault, L.A., Grasso, F., Lussier, J.G., Rouillier, P y Matton, P. (1991). Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J Reprod Fertil.* 91:81-89.

Hansen, P. J., Drost, M., Rivera, R.M., Paula, F.F., Lopes, Y., AlKatanani, K., Krininger, C.E, y Chase, C.C. (2001). Adverse impact of heat stress on embryo production: Causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 55:91–103.

Hendriksen P. J. M., Gadella B. M., Vos P. L. A. M., Mullaart E., Kruip T. A. M., y Dieleman, S. J. (2003). Follicular Dynamics Around the Recruitment of the First Follicular Wave in the Cow. *Biology of Reproduction* 69(6):2036-2044.

Jordan, E.R. (2003). Effects of Heat Stress on Reproduction. *J. Dairy Sci.* 86:104–114.

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

Larocca C.E., Fernandez A., Gonzalez A.F y Carbo A.A. (1995). The efficiency of different gonadotrophin preparations on the superovulatory responses of holstein cows. *Theriogenology*, 43:261(1).

Leroy, J.L., Opsomer, G., Vlieghe, S., Vanholder, T., Goossens, L., Geldhof, A., Bols, P.E., Kruifa, A y Soom, A.V. (2005). Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*. 64:2022-2036.

Leyva, C., Barreras, A., Varisanga, D. (1999) Transferencia de embriones no quirúrgica en ganado bovino. U.A.B.C. Mexicali, B. C.

Lindsell, C.E., Pawlyshn, V., Bielanski, A y Mapletoft, R.J. (1985). superovulation of heifers with FSH-P beginning on four different days of the cycle. *Theriogenology* 23:203.

Loos, F.A., Bevers, M.M., Dieleman, S.J., y Kruij, A.M. (1991). Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. *Theriogenology*. 35:537-546.

Lucy, M.C. (2007). The bovine dominant ovarian follicle. *Journal Animal Science* 85:89-99.

Macmillan, K.L., Segwawe, B.V.E., Pino, C.S. (2003). Association between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. *Animal Reproduction Science* 78:327-344.

Mapletoft, R.J., Steward, K.B y Adams G.P. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:601–611.

McDowell, C. M., Anderson, L.H., Kinder J.E., Day, M.L. (1998). Duration of treatment with progesterone and regression of persistent ovarian follicles in cattle. *J Anim Sci.* 76:850-855.

Mc Gowman, M., Braithwaite, M., Jochle, W, y Mapletoft, R. (1985). Superovulation of beef heifers with pergonal (HMG): A dose response trial. *Theriogenology* 24; 173-184.

Monnlaux, D., Chupin, D, y Saumande, J. (1983). Superovulatory response of cattle. *Theriogenology* 19;55-81.

Morales, C.J. (2001). Resultados comparativos entre un preparado de FSH-P y la eCG administrado por vía aorta abdominal en un programa de transferencia de embriones en vacas lecheras de la comarca lagunera. *Memorias del Congreso nacional de buiatria 2001, Veracruz México.*

Moreira, F., Badinga, L., Burnley, C., y Thatcher, W.W. (2002). Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*. 57(4):1371-1387.

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

Nakajima, A., Hiraizumi, S., Onodera, K., Suzuki, H., Kudo, y Dōmeki yo. (1992). The use of bovine anti-PMSG serum in beef cattle after PMSG-superovulation. *J Vet Med Sci*; 54:95-98.

Nasser, L.F., Adams, G.P., Bó, G.A., Mapletoft. R.J. (1993). Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 40:713-724.

Palma, G.A. (1993). *Transferencia de Embriones y Biotecnología de la Reproducción en la especie bovina*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires Argentina.

Padmanabhan, V., Y McNeilly, A.S. (2001). Is there an FSH-releasing factor?. *Reproduction* 121,21-30.

Padmanabhan, V., Karsch, F.J., y Lee, J.S. (2002). Hypothalamic, pituitary and gonadal regulation of FSH. *Reproduction supplement* 59.67-82.

Putney, D. J., M. Drost, and W. W. Thatcher. (1989). Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*. 31(4):765-778.

Roth, Z. (2008). Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. *Reprod Domest Anim*. 43(2):238-244.

SAGARPA, (2006). Situación actual y perspectiva de la producción de carne de bovino de México 2006. <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg>.

Solórzano., H. C., Hernández M.J., Galina, H.C., Villa, G.A., Vera A.H., y Romo, G.S. (2008). Reuse of a progesterone releasing device (CIDR-B) for estrus synchronization within an embryo transfer program in bovines. *Tec Perú México* 46(2):119-135.

Son, D.S., Choe, C.Y., Cho, S.R., Choi, S.H., Kim, H.J y Kim, I.H. (2007). The effect of reduced dose and number of treatments of FSH on superovulatory response in CIDR-treated Korean native cows. *J Reprod Dev*; 53:1299-1303.

Sunderland, S.J., Crowe, M.A., Boland, M.P., Roche, J.E., y Ireland, J.J. (1994). Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 101,547-545.

Wakuma, A.I., Suzuki, Y., Haneishi, T., Kajisa, M y Kamimura. (2008). Efficacy of intravaginal progesterone administration combined with prostaglandin F_{2α} for cystic ovarian disease in japanese black cows. *J. Vet. Med. Sci.* 70(10):1077-1083.

Webb, R., Nicholas, B., Gong, J.G., Cmpebell, B.K., Gutierrez, C.G., Garverick, H.A., y Armstrong, D.G. (2003). Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction supplement.* 61:71-90.

Wilson, S. J., Marion, R.S., Spain, J.N., Spiers, D.E., Keisler,y, D.H y Lucy, M.C. (1998). Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J. Dairy Sci.*81:2124–2131.

Wiltbank, M.C., Shiao. T.F., Bergfelt, D.R., Ginther O.J. (1995). Prostaglandin F₂ Receptors in the Early Bovine Corpus Luteum'. *Biology of Reproduction* 52, 74-78.

Wolfenson, D., Roth, Z y Merdan, R. (2000). Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61:535–547.

Zizlavsky, J., Riha, J., Urban, F., Machol, L., Stipkova. (2002). Production of embryos from repeted superovulations of cows during one calving interval. *J. anim, Sci.*, 47 (3): 92-97.