

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



TASA DE GESTACIÓN EN VACAS RECEPTORAS HOLSTEIN EMPLEANDO
EMBRIONES CRIOPRESERVADOS ESTADIO BLASTOCITO EXPANDIDO EN
DOS REGIONES SEMIÁRIDAS DE MÉXICO

Tesis

Que presenta MAYRA ESTER ENRÍQUEZ MARTÍNEZ
como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila

Diciembre 2022

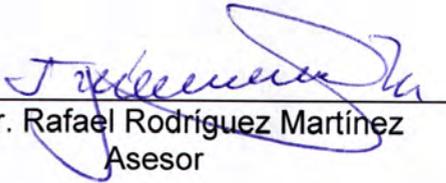
TASA DE GESTACIÓN EN VACAS RECEPTORAS HOLSTEIN, EMPLEANDO
EMBRIONES CRIOPRESERVADOS ESTADIO BLASTOCITO EXPANDIDO EN
DOS REGIONES SEMIÁRIDAS DE MÉXICO

Tesis

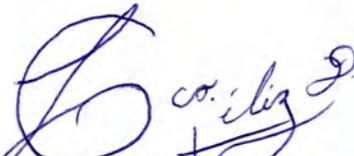
Elaborada por MAYRA ESTER ENRÍQUEZ MARTÍNEZ como requisito parcial
para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria
con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



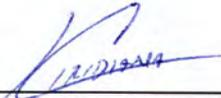
Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Director de Tesis



Dr. Rafael Rodríguez Martínez
Asesor



Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras
Asesor



Dra. Viridiana Contreras Villarreal
Asesor



Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Antonio Flores Naveda
Subdirector de Postgrado

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y a los docentes que me impartieron sus enseñanzas y conocimientos para crecer en mi formación profesional.

Para la empresa A.B.S, México S.A de C.V, le expreso mi gratitud por brindarme todas las condiciones necesarias para llevar a cabo la presente investigación.

A la Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno le expreso mi gratitud, admiración y respeto, por su acertada dirección, conocimientos impartidos y paciencia desde el principio hasta la culminación de la presente tesis.

A mi comité de tesis Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno, Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras, Dr. Viridiana Contreras Villarreal, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo la presente investigación bajo su dirección y orientación.

Para CONACYT, por el apoyo necesario que me permitió culminar mi investigación.

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación está dedicado a dios, forjador de mi vida que siempre ha sido llena de otorgamientos. Gracias padre celestial, por brindarme salud y abirme las puertas a buenas oportunidades, poniendo siempre a las personas adecuadas en mi camino, que me han ayudado a cumplir mis objetivos y crecer profesionalmente.

Índice general

Resumen	viii
Abstract	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	1
3.1 Descripción de la raza Holstein	1
3.1.1 <i>Origen</i>	1
3.1.2 <i>Sinónimos</i>	1
3.1.3 <i>Características morfológicas</i>	1
3.2 Fisiología reproductiva de la hembra bovina.....	2
3.2.1 <i>Eje hipotálamo-hipófisis-ovario</i>	2
3.2.1.1 Hipotálamo e hipófisis.	3
3.2.1.2 Ovarios.	4
3.2.1.3 Útero.....	5
3.3 Fases del ciclo estral	6
3.3.1 <i>Proestro (regresión lútea)</i>	6
3.3.2 <i>Estro</i>	6
3.3.3 <i>Metaestro</i>	7
3.3.4 <i>Diestro</i>	8
3.3.5 <i>Anestro</i>	9
3.4 Dinámica folicular	10
3.5 Desarrollo del cuerpo lúteo	14
3.5.1 <i>Luteinización</i>	15
3.5.2 <i>Lúteolisis</i>	15
3.6 Descripción de la técnica de aspiración folicular transvaginal (OPU). 16	
3.6.1 <i>Aspiración folicular transvaginal</i>	17
3.6.2 <i>Selección de ovocitos</i>	18
3.6.3 <i>Maduración de ovocitos (MIV)</i>	19
3.6.4 <i>Fertilización In Vitro (FIV)</i>	20

3.6.5 Cultivo de embriones (CIV)	21
3.6.6 Criopreservación embrionaria	24
3.6.7 Sincronización de receptoras	25
3.6.8 Transferencia de embriones y diagnóstico de gestación.....	26
3.7 Criterios para seleccionar una hembra donante.....	27
3.8 Criterios para la selección de hembras receptoras.	27
3.9 Beneficios de la técnica de aspiración folicular transvaginal (OPU) ...	28
3.10 Desventajas de la técnica OPU	30
3.11 Factores ambientales relacionados con la reproducción de las hembras del ganado bovino	30
3.11.1 Cambio climático	30
3.11.2 Efectos de estrés calórico en el sistema reproductivo del ganado bovino de leche.	31
3.12 Principales factores que afectan la capacidad de implantación de un embrión proveniente de OPU en receptoras Holstein.	33
3.13 Balance termino de bovinos	34
3.14 Situación productiva de leche en el país	35
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
4.1 Manejo de los animales.....	37
4.2 Área de estudio y condiciones climáticas	37
4.3 Manejo de los animales y colección embrionaria	37
4.4 Procedimiento de la OPU.....	38
4.5 Procedimiento de la selección de ovocitos.....	38
4.6 Procedimiento para la maduración de ovocitos.....	38
4.7 Procedimiento para la fertilización de ovocitos.....	39
4.8 Procedimiento del cultivo de embriones	39
4.9 Criopreservación embrionaria	40
4.10 Sincronización	40
4.11 Transferencia y diagnóstico de gestación	40
V. RESULTADOS.....	41
VI. DISCUSIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
VII.	45
CONCLUSIÓN.....	45
VIII. REFERENCIAS	46

Lista de cuadros

- 1.- Esquema simplificado de las interacciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero de hembras bovinas lecheras

Lista de figuras

1.- Esquema simplificado de las interacciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero de hembras bovinas lecheras	6
2.- Esquema simplificado del crecimiento folicular.	10
3.- Esquema simplificado del crecimiento del cuerpo lúteo.	12
4.- Imagen tomada durante la realización del presente estudio	23
5.- Representa las diferentes etapas del desarrollo embrionario.	27

Resumen

TASA DE GESTACIÓN EN VACAS RECEPTORAS HOLSTEIN EMPLEANDO EMBRIONES CRIOPRESERVADOS ESTADIO BLASTOCITO EXPANDIDO EN DOS REGIONES SEMIÁRIDAS DE MÉXICO

MAYRA ESTER ENRÍQUEZ MARTÍNEZ

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Director de tesis

Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno

La transferencia de embriones es una de las tecnologías más utilizada en la actualidad en la mejora del ganado; sin embargo, existen diversos factores que pueden afectar la eficiencia de técnica. Uno de los principales factores que se han asociado a la baja efectividad son los cambios metabólicos producidos por el estrés calórico. Por lo anterior el presente estudio tiene por objetivo determinar la tasa de gestación en vacas receptoras Holstein empleando embriones criopreservados estadio blastocito expandido en dos regiones semiáridas de México. Para este trabajo se seleccionaron vacas receptoras con rango de 60 a 90 días de lactancia y con una producción láctea mayor a 10,000 kg. Se incluyeron un total de 825 vacas Holstein, de las cuales 336 pertenecen al estado de Chihuahua y 489 de la Comarca Lagunera. Posteriormente se sometieron a un programa de transferencia embrionaria, con embriones procedentes de la técnica OPU, los cuales de manera homogénea se encontraban en su grado de blastocito expandido de calidad uno. Los factores ambientales tienen una relación directa sobre la eficiencia de las biotecnologías reproductivas. Las receptoras de raza Holstein que reciben embriones provenientes de la técnica OPU son afectadas en su eficiencia reproductiva por las elevadas temperaturas presentes en dos de las cuencas lecheras más importantes del país; La Comarca Lagunera y Chihuahua.

Palabras claves: Transferencia de embriones, Medio ambiente, Holstein

Abstract

REGNANCY RATE IN HOLSTEIN RECIPIENT COWS USING CRYOPRESERVED EMBRYOS EXPANDED BLASTOCYTE STAGE IN TWO SEMI-ARID REGIONS OF MEXICO

MAYRA ESTER ENRÍQUEZ MARTÍNEZ

To obtain the degree of Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Thesis director
Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno

Embryo transfer is one of the most used technologies currently in cattle improvement; however, there are several factors that can affect the efficiency of the technique. One of the main factors that have been associated with low effectiveness are the metabolic changes produced by heat stress. Therefore, the objective of this study is to determine the gestation rate in recipient Holstein cows using cryopreserved embryos at the expanded blastocyst stage in two semi-arid regions of Mexico. For this work, recipient cows with a range of 60 to 90 days of lactation and with a milk production greater than 10,000 kg were selected. A total of 825 Holstein cows were included, of which 336 belong to the state of Chihuahua and 489 from the Comarca Lagunera. Subsequently, they underwent an embryo transfer program, with embryos from the OPU technique, which were homogeneously in their quality one expanded blastocyst grade. Environmental factors have a direct relationship on the efficiency of reproductive biotechnologies. Holstein breed recipients who receive embryos from the OPU technique are affected in their reproductive efficiency by the high temperatures present in two of the most important dairy basins in the country; The Lagunera Region and Chihuahua.

Keywords: Embryo transfer, Environment, Holstein

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente los productos lácteos son altamente consumidos por la población mexicana, siendo estos los principales productos consumidos en cada hogar (Cavalloti *et al.*, 2019) sin embargo, en las últimas décadas el país presenta un déficit en su producción de leche fluida, razón por la cual se importan grandes cantidades de leche y sus derivados, siendo México, el país número uno en importar leche de polvo a nivel mundial (Loera y Banda, 2017).

En el país la producción de leche se concentra en cuencas lecheras especializadas, donde desde 2016 la región de la Comarca Lagunera se posicionó como la principal ya que se produce el 21 % de la leche del país (Espinoza *et al.*, 2018), seguido del estado de Chihuahua donde se produce el 9.5 % (CANILEC, 2020). En estas regiones predomina la implementación de sistemas intensivos donde se utiliza ganado bovino de raza Holstein (Espinoza *et al.*, 2018).

Al respecto el aumento en la productividad de los bovinos de leche está relacionado con la genética y la eficiencia reproductiva (Viera *et al.*, 2014), por lo anterior en las últimas décadas se ha realizado un gran desarrollo en el área de biotecnología de la reproducción animal *in vitro* (Rosete *et al.*, 2021), donde la técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU, Ovum Pick-Up) se ha posicionado como una de las técnicas más importantes para los productores bovinos a nivel mundial (Ruiz, 2010; Bonilla *et al.*, 2019).

Esta técnica permite obtener una mayor producción de descendencia de animales con alto valor genético, acelerando la mejora animal y reduciendo los intervalos de tiempo productivos (Bonilla *et al.*, 2019). Dicho método puede ser empleado en vacas vacías, gestantes, vacas con problemas de fertilidad o que no responden a tratamientos hormonales o incluso en animales post mortem (Ruiz, 2010; Quisque *et al.*, 2018). Existen reportes donde se ha logrado producir hasta 100 embriones por año y 50 terneros por vaca donante (Van Wagtenndonk, 2006).

Sin embargo, existen diferentes factores que afectan la eficiencia de la técnica OPU (Viera *et al.*, 2014), como lo pueden ser factores técnicos, biológicos y medio ambientales. De los principales factores técnicos son los parámetros

de preservación de embriones, criopreservación y etapa del embrión transferido (Kimura y Matsuyama, 2014). En los factores biológicos podemos mencionar el número de partos (Viera *et al.*, 2014) y en los factores medio ambientales se ha reportado que altas temperaturas y la humedad relativa, tienen efectos sobre la fisiología reproductiva de la raza Holstein (Arias *et al.*, 2008), afectando el celo, el desarrollo folicular, desarrollo embrionario y la implantación, siendo este último factor muy determinante y poco estudiado (Góngora y Hernández, 2010).

Las hembras Holstein producen cambios metabólicos, para disipar su calor corporal, disminuyen su flujo sanguíneo afectando el adecuado funcionamiento de estructuras como el útero, ovarios, oviducto y cuello uterino, lo cual podría generar una respuesta negativa en la hembra receptora, que recibe un embrión transferido (Ferreira *et al.*, 2011). Por lo anterior el presente estudio tiene por objetivo determinar la tasa de gestación en vacas receptoras Holstein empleando embriones criopreservados estadio blastocito expandido en dos regiones semiáridas de México.

HIPÓTESIS

La tasa de gestación en vacas receptoras Holstein empleando embriones criopreservados estadio blastocito expandido, será similar en dos regiones semiáridas productoras lecheras del país.

II. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la situación de la producción de leche en el país requiere una mayor eficiencia productiva, para cubrir las necesidades alimentarias y nutricionales de su población. Ya que en las últimas décadas México es el principal importador de leche en polvo a nivel mundial, lo que demuestra que existe un déficit en su producción de leche y sus derivados. Para hacer eficiente dicha producción se tiene que mejorar la genética y la reproducción del ganado bovino de raza Holstein el cual es el ganado más empleado en el país. Por ello se desea estudiar la técnica OPU en esta raza ya que actualmente es la biotecnología con mejores resultados productivos alrededor del mundo. Sin embargo, existen diferentes factores que afectan el éxito de esta técnica; los parámetros de preservación como la criopreservación, el número de partos y las condiciones ambientales, provocan que la técnica disminuya su respuesta positiva. Por lo anterior el presente estudio desea analizar las variables anteriormente descritas.

Objetivo general

- Evaluar la tasa de gestación en vacas receptoras Holstein, empleando embriones criopreservados en estadio blastocito expandido, en dos regiones semiáridas de México

Objetivos específicos

- Determinar la tasa de gestación en vacas receptoras Holstein; considerando el número de partos empleando embriones criopreservados estadio blastocito expandido en la región de la Comarca Lagunera y el estado de Chihuahua.

- Comparar la tasa de gestación en vacas receptoras Holstein empleando embriones criopreservados estadio blastocito expandido en la región de la Comarca Lagunera y el estado de Chihuahua.
- Cuantificar el número de pérdidas de embrionarias en vacas receptoras Holstein, empleando embriones criopreservados estadio blastocito expandido en la región de la Comarca Laguna y el estado de Chihuahua.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Descripción de la raza Holstein

3.1.1 Origen.

Su origen se encuentra en Holanda, en las provincias de Frisia y Holanda del Norte, aunque actualmente se encuentra dispersa a nivel mundial. Se tienen registros que desde hace más de 2,000 años se ha utilizado ganado bovino de producción lechera. Desde esta época se comenzó a realizar selección artificial, donde los antiguos productores escogían a aquellos animales que les brindaban un mejor rendimiento (Mcmeekan,1991).

3.1.2 Sinónimos.

La raza Holstein es conocida alrededor del mundo con diferentes nombres; Holstein Friesian en los países de Norte América como Estados Unidos y Canadá, British Friesian en Gran Bretaña, Friesian en Nueva Zelanda y Pier Noire Hollandaise en Francia, sólo por mencionar algunos (Mcmeekan,1991).

3.1.3 Características morfológicas.

La raza Holstein es de tamaño grande, con una complexión esquelética robusta, presentan ubres muy desarrolladas, siendo el pelaje dominante el negro y blanco con un fenotipo recesivo en color rojo, sus extremidades y vientre son de color blanco mientras que sus características manchas negras, se encuentran dispersas en casi todo su cuerpo, son animales que presentan una morfología descarnada, esta es de las mayores productoras de leche, con un promedio anual de 8,700 litros en Estados Unidos (Mcmeekan,1991).

Sin embargo, tienen el menor porcentaje de grasa corporal, las hembras pesan en promedio 680 kg y los machos pesan entre 1,100 a 1,300 kg. Los cuernos son de tamaño mediano, aunque siempre se practica el descornado. Las hembras generalmente son sometidas a un primer servicio a la edad de 15 meses (Ballent *et al.*, 2003).

3.2 Fisiología reproductiva de la hembra bovina.

A partir de los 12 meses de edad las hembras bovinas que son criadas en sistemas intensivos, comienzan sus ciclos reproductivos, a esta edad se considera que una vaca ha atravesado su pubertad y se encontrará en condiciones óptimas para ser sometida a su primer servicio (Hernández, 2016). Generalmente a los 24 meses de edad tienen su primer ternero, sin embargo, estas condiciones solo son posibles cuando el animal se encuentra en un estado óptimo de salud, y también si se cumplen adecuadamente las condiciones ambientales y fisiológicas (Hernández, 2016).

La reproducción es una función realizada por un ser vivo, la cual tiene el objetivo de asegurar la supervivencia a través del tiempo de la especie, de tal manera que la formación de nuevos individuos sustituye a aquellos que han muerto (Biggs, 2012). Las características reproductivas de las hembras bovinas se caracterizan por presentar ciclos estrales con una duración de entre 19 a 23 días. Dichos ciclos pueden ser interrumpidos fisiológicamente por el anestro de gestación o posterior a la lactancia, o incluso por un anestro debido a una patología, una deficiencia nutricional entre otros factores, generalmente suelen parir solo 1 ternero (Hernández, 2016).

A continuación, se realiza una descripción de la fisiología reproductiva de la hembra bovina mediante una revisión bibliográfica.

3.2.1 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

El ciclo estral de las vacas lecheras se rige por un control neuroendocrino, que se realiza a través del hipotálamo-hipófisis-ovario. A través de estos órganos se producen hormonas (Hernández, 2016). De acuerdo a la interacción de estas hormonas se les puede clasificar de cuatro formas; 1) las hormonas que actúan sobre la misma célula que las segrega se denominan de actividad autocrina, 2) aquellas que lo hacen a través de otras células que se encuentran cercas de ellas se denominan de actividad paracrina, 3) mientras que aquellas que ejercen funciones en las células de otros órganos se denominan de actividad endocrina y 4) se denominan feromonas a aquellas que regulan diferentes funciones principalmente reproductivas (Hernández, 2016).

3.2.1.1 Hipotálamo e hipófisis.

El hipotálamo es un órgano ubicado en la base del cerebro, su función consiste en convertir señales neurológicas a partir de estímulos externos e internos, generando descargas hormonales (Callejas, 2001). Este órgano se comunica con la hipófisis a través de un canal circulatorio conocido como sistema porta-hipotálamo-hipófisis. La hipófisis a su vez se divide en dos secciones, la primer parte anterior es conocida como adenohipófisis mientras que la parte posterior es conocida como neurohipófisis (Callejas, 2001).

La adenohipófisis posee células basófilas especializadas en secretar varios tipos de hormonas entre las más relevantes tenemos a las gonadotropinas: la hormona foliculoestimulante y luteinizante (por sus siglas en inglés FSH y LH, respectivamente) (Hernández, 2016). Mediante el hipotálamo se produce la hormona encargada de segregar la hormona liberadora de gonadotropinas, (por sus siglas en inglés GnRH), esta hormona a través del canal porta-hipotálamo-hipófisis, llega a la hipófisis provocando la liberación de la LH y la FSH, durante la etapa prepuberal (Hernández, 2016).

Estas hormonas son liberadas en el sistema circulatorio en forma de pulsos, y mantienen su equilibrio mediante dos sistemas, el tónico y el cíclico. El sistema tónico regula el nivel adecuado de hormonas hipofisarias presentes en el nivel basar circulante, las cuales promueven el desarrollo de las funciones endocrinas y germinales de las gónadas. El sistema cíclico opera en intervalos cortos de tiempo de 12 a 24 horas, durante los ciclos reproductivos de la hembra y tiene como función causar la ovulación (Hernández, 2016).

Mediante el hipotálamo la GnRH realiza su síntesis y secreción en base a dos señalamientos: el primero es realizado por estímulos externos (durante la fase de lactancia por estímulo del becerro, fotoperiodo y bioestimulación), así como también por estímulos internos (función hormonal y función metabólica). Mientras que el segundo señalamiento que provoca la síntesis de esta hormona es el estro, mediante estrógenos (Hernández, 2016).

Los estrógenos a su vez pueden realizar una retroalimentación negativa o positiva sobre la liberación de la hormona GnRH, esto se rige de acuerdo con

los estímulos que se presenten. Por ejemplo, la progesterona, tiene la capacidad de inhibir la secreción de GnRH durante el anestro y posparto, causando así que la ovulación no se lleve a cabo (Figura 1). Mientras que durante la etapa proestro y estro estimulan la secreción de GnRH (Hernández, 2016).

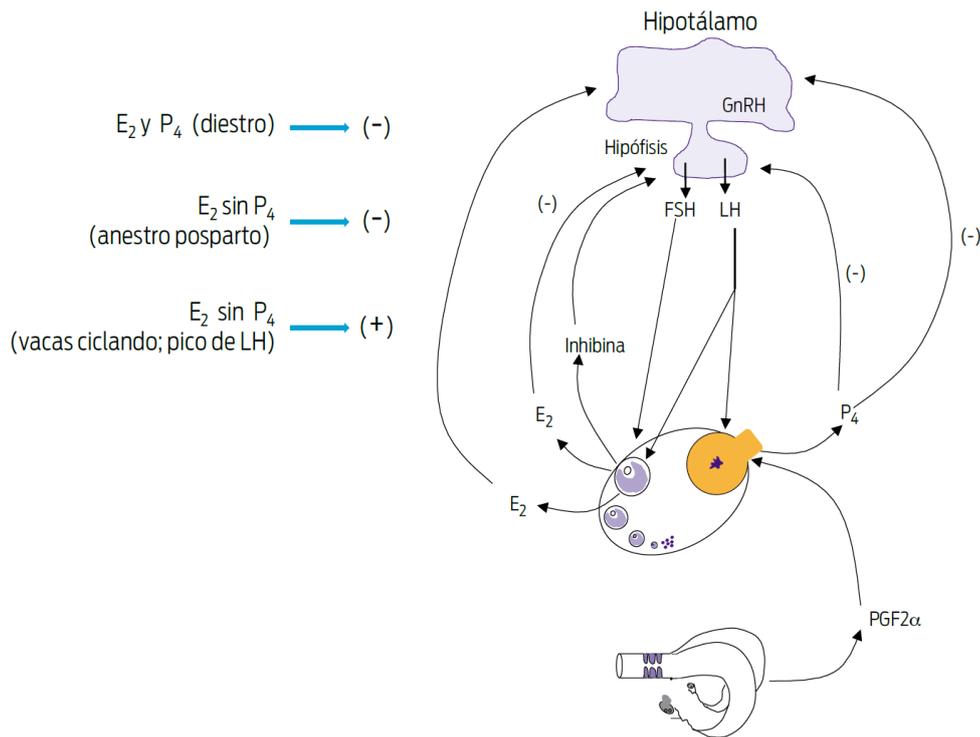


Figura 1.- Esquema simplificado de las interacciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero de hembras bovinas lecheras. La GnRH a través del canal hipotálamo-hipófisis provoca la síntesis y secreción de gonadotropinas (LH y FSH). Los estrógenos (P_4 e inhibina) realizan una retroalimentación negativa donde inhiben la secreción de GnRH en la etapa prepuberal, anestro y posparto, mientras que en el proestro y estro realizan una estimulación para la liberación de GnRH. La prostaglandina ($PGF2\alpha$), inhibe la secreción de P_4 impidiendo la ovulación. El estradiol E_2 genera una retroalimentación negativa a nivel hipotálamo-hipófisis frenando la liberación de LH Y FSH (tomado de la obra de Hernández, 2016).

3.2.1.2 Ovarios.

Los ovarios de acuerdo con su función tienen dos definiciones, glándulas exocrinas ya que liberan óvulos y glándulas endocrinas, debido a que liberan hormonas entre las más destacables se encuentran los estrógenos, la progesterona (P_4) y la inhibina (Figura 1), la primer mencionada es producida

por el folículo ovárico y tienen acciones sobre las células blanco del útero, vagina, vulva y trompa de Falopio, así como también en el sistema nervioso central donde estimulan el celo (Callejas, 2001).

Por otro lado, la progesterona es producida por el cuerpo lúteo, esta hormona es la encargada de preparar el útero para permitir la implantación del embrión y mantenimiento de la gestación (Figura 1). La inhibina es una hormona secretada por el folículo del ovario y tiene la función de producir una retroalimentación negativa a nivel hipófisis (Figura 1), lo que produce una menor cantidad de FSH secretada (Callejas, 2001).

En el ganado lechero se estima que los ovarios miden aproximadamente 2-4 cm de diámetro. Estos órganos a pesar de su tamaño almacenan ovocitos y la cantidad de estos varía según su genética, se ha reportado que las subespecies que pertenecen a *Bos Taurus* tiene una menor cantidad en comparación con las subespecies que pertenecen a *Bos Indicus*, esta carga de ovocitos, fueron desarrollados desde antes del nacimiento de las hembras y solo un bajo porcentaje de estos se desarrollara durante su vida productiva (Báez *et al.*, 2010).

3.2.1.3 Útero.

En el útero se produce la hormona llamada prostaglandina F_{2a} (PGF_{2a}), esta hormona regula el ciclo estral, así como también interviene en los mecanismos de ovulación y parto. La PGF_{2a} tiene un mecanismo de retroalimentación negativa donde genera una inhibición de la síntesis y secreción de P₄, de tal manera que se impide la ovulación. La PGF_{2a} se cree que se libera del útero hacia el cuerpo Lúteo (CL) desde las venas uterinas. De igual manera el estradiol E₂ posee un mecanismo de retroalimentación negativa donde causa una inhibición en el canal hipotálamo-hipófisis impidiendo la secreción de las hormonas FSH y LH (Hernández *et al.*, 2008).

A continuación, se realiza una breve síntesis de las interacciones hormonales efectuadas por una hembra bovina durante su ciclo reproductivo, del eje hipotálamo-hipófisis y sus diferentes estructuras reproductivas.

3.3 Fases del ciclo estral

El ciclo estral de las hembras bovinas se divide por cinco fases: proestro, estro, metaestro, diestro y anestro. Durante estas etapas se desencadenan una serie de funciones fisiológicas, ocurriendo cambios en algunos órganos y en las concentraciones hormonales, todo esto ocurre para que la hembra bovina pueda ciclar de manera adecuada (Hernández, 2016).

3.3.1 Proestro (*regresión lútea*).

La fase del proestro comienza con la lisis del CL del ciclo estral anterior y finaliza con la presencia del celo, también conocida como regresión del cuerpo lúteo anterior, esta fase tiene una duración aproximada de tres días (Guaqueta, 2009). Para que esto ocurra, a nivel hormonal se llevan a cabo una serie de reacciones, donde mediante la secreción de la PGF2a, producida por el útero se generan niveles de P₄ muy bajos, se teoriza que de esta manera se realiza una lisis del CL del ciclo estral anterior, donde se produce una pérdida del tejido lúteo (Guaqueta, 2009).

Después de este proceso se lleva a cabo el crecimiento de muchos folículos preovulatorios, sin embargo, solo uno se desarrollará hasta ser un folículo dominante (FD), el cual llevará a cabo el proceso de ovulación (Guaqueta, 2009). Esto ocurre como reacción a la caída de los niveles de progesterona, donde disminuye su retroalimentación negativa a nivel hipotálamo, y se produce una secreción de FSH y LH (Price y Orihuela, 2010).

El resto de los folículos que no generan ovulación son denominados atrésicos, la diferencia entre estas dos categorías de folículos son las concentraciones de hormonas FSH y LH a las cuales son sometidos, de tal manera los folículos FD al poseer una mayor concentración hormonal, en comparación con los folículos atrésicos aumentan la producción de estrógenos los cuales incrementan el tamaño de la cavidad antral, de esta manera comienza el periodo de celo o también denominado estro (Guaqueta, 2009; Price y Orihuela, 2010).

3.3.2 Estro.

La fase denominada como estro, es más comúnmente conocida como celo, es la fase preovulatoria, donde se considera como día cero del ciclo estral al día del estro (Ortega *et al.*, 2011). En este periodo la hembra experimenta una fase de receptividad sexual positiva. Los signos externos de esta fase son un útero firme y erecto, así como una hinchazón de la vagina (Price y Orihuela, 2010). La conducta de la vaca también se ve afectada por este proceso, ya que se le puede observar con inquietud y ansiedad, signos que son acompañados con una pérdida del apetito y en el caso las hembras lecheras se registra una menor producción láctea (Ortega *et al.*, 2011).

Al respecto otros de los signos observados en vacas durante esta etapa es la presencia de mucus filante, que contiene feromonas que atraen al macho (Ortega *et al.*, 2011). Además, se produce una serie de contracciones en el tracto reproductivo, que tiene como objetivo facilitar la concepción (Guaqueta, 2009). Estos signos externos son resultado de un pico en la liberación de la LH a través de la hipófisis mientras que la FSH disminuye su concentración por acción de la retroalimentación negativa por parte de los estrógenos y la inhibina (Ortega *et al.*, 2011).

Sin embargo, al presentarse el pico preovulatorio de LH en sincronización también ocurre un pico de FSH (Ortega *et al.*, 2011). Durante el estro como una consecuencia de la interacción hormonal el desarrollo folicular llega a su punto máximo (Ortega *et al.*, 2011). La duración de esta etapa es muy variable, pero se considera aproximada de 12 a 24 horas (Figura 3), lo cual es característico de hembras bovinas, ya que es un periodo muy corto comparado con otros mamíferos, esta fase tiene por objetivo poner susceptible a la hembra para permitir la monta y generar una fecundación (Guaqueta, 2009).

3.3.3 *Metaestro.*

Después de la finalización del estro o celo, ocurre la fase de metaestro, la cual tiene una duración aproximada de dos a tres días. Durante esta fase se produce la ovulación (Ortega *et al.*, 2011). Durante este periodo el funcionamiento del ovario es controlado mediante eventos endocrinos, aproximadamente 30 horas después del pico de LH y FSH producido durante

el estro, ocurre una ruptura del folículo, produciendo la ovulación (Ortega *et al.*, 2011). Durante esta etapa las células tecas y de granulosa en sincronía con la hormona LH producen efectos sobre el folículo para desarrollar el cuerpo lúteo, encargado de provocar la secreción de progesterona, la cual es de gran importancia para mantener la gestación, ya que esta hormona genera un ambiente uterino adecuado (Guaqueta, 2009).

Seguido de esto se lleva a cabo el proceso de luteinización (para más información, consultar el tema de luteinización), donde ocurren cambios fisiológicos y se produce un CL que da paso a que se genere la ovulación. Después de la ovulación el ovulo expulsado recorre su camino a través de las trompas de Falopio y después por el oviducto, hasta llegar a la región denominada útero-tubárica (Guaqueta, 2009).

En caso de ocurrir la fecundación esta tiene lugar en el tercio anterior del oviducto y en el caso contrario de no encontrarse con espermatozoides el ovulo se hace impermeable y comienza su degeneración (Figura 3), al respecto los signos externos observables son la expulsión de moco con sangre por la vagina y un cambio en la conducta de la hembra, donde ya no se muestra susceptible para la monta, estos signos son indicativos de que el celo ya ha ocurrido (Guaqueta, 2009).

3.3.4 Diestro.

Esta fase se lleva a cabo inmediatamente después del metaestro, esta fase también es conocida como fase luteal. Esta es la fase más larga de todo el ciclo estral donde el cuerpo lúteo genera grandes cantidades de P_4 , aun cuando la vaca este gestante o no (Guaqueta, 2009). La segregación de P_4 como ya se mencionó anteriormente crea un ambiente uterino óptimo para un embrión, esta hormona causa que el miometrio se hipertrofie generando una secreción viscosa espesa que sirve para nutrir a un embrión, además, dicha hormona tiene efectos sobre el desarrollo de las glándulas mamarias (Guaqueta, 2009).

La síntesis de la hormona P_4 , así como el adecuado mantenimiento del cuerpo lúteo están regidos por la LH, además otras hormonas que participan son la FSH y la PG12. En caso de producirse la concepción el cuerpo lúteo

permanece durante toda la gestación y desaparece aproximadamente 30 días después del parto, en caso de que el cuerpo lúteo se pierda durante los primeros cinco meses de gestación, se produce un aborto (Ortega *et al.*, 2011). En caso de que el cuerpo lúteo desaparezca 5 meses después de la gestación, ya no se produce un aborto debido a que después de este tiempo la placenta mantiene la gestación (Ortega *et al.*, 2011).

Por otro lado, si el ovulo no se encuentra en su camino con un espermatozoide y por lo tanto no es fecundado entonces el cuerpo lúteo desaparece aproximadamente el día 15 o 20, en un proceso denominado luteólisis, este proceso se lleva a cabo por medio del útero que libera la hormona PGF2a causando una disminución drástica en los niveles de P₄, después de ello comienza la preparación para un nuevo ciclo estral, que comienza con una nueva onda folicular provocada por estimulación de FSH (para más información consultar el tema luteólisis) (Ortega *et al.*, 2011).

3.3.5 Anestro.

El presente tema desarrollado se realiza en base a la consulta bibliográfica de la obra publicada por Báez *et al.*, (2009), titulada "Anestro posparto en ganado bovino en el trópico".

La fase el anestro es el periodo después del parto, en el cual las vacas no muestran señales de celo o estro, ya que ocurre una inactividad ovárica es decir el anestro se refiere a una ausencia de etapa de calor en una hembra, esta etapa puede producirse por causas fisiológicas, patologías o por cuestiones de estrés. Entre las causas fisiológicas se encuentra la prepubertad, periodo en el cual la hembra aún no ha comenzado su ciclo estral, por lo tanto, su cuerpo aún no se encuentra fisiológicamente preparado para alojar una gestación.

Al respecto otra razón fisiológica por la cual ocurre el anestro es por la presencia de gestación, ya que se inhiben la secreción y síntesis de las hormonas FSH y LH, además la lactancia es otro factor fisiológico que puede producir anestro, el amamantamiento tiene efectos directos sobre el hipotálamo y provoca una retroalimentación negativa que reduce la secreción de gonadotropinas GnRH, como se ha mencionado anteriormente en el

presente trabajo este conjunto de hormonas tienen la función de provocar la dinámica folicular, desarrollo del CL y la generación de ovulación. Generalmente después de 2 a 3 semanas se comienza a producir de manera normal la secreción de las hormonas LH y FSH.

La adecuada alimentación en las vacas es un factor determinante para llevar a cabo adecuadamente sus funciones reproductivas, si la ración que se imparte a una hembra bovina no es balanceada el sistema reproductivo se ve afectado ya que en mamíferos el crecimiento y la lactancia tienen prioridad por encima de procesos reproductivos ante una deficiencia nutricional, aunque también en presencia de un exceso de ingesta de alimento con una gran cantidad de proteínas puede alterar las funciones del sistema endocrino.

Diferentes estudios han mostrado que la raza, la edad el número de partos, la presencia del toro o del ternero y la temporada en la que se produce el parto, pueden provocar la presencia del anestro. Así como también ha sido reportado que el estrés ya sea calórico o por manejo también puede desencadenar el anestro. Actualmente existe mucha controversia con los efectos de estrés sobre el sistema reproductivo de las hembras bovinas, sin embargo, la mayoría de las investigaciones apuntan a que ante una situación de estrés calórico (EC) disminuyen su ingesta de materia seca consumida, lo que puede llegar a provocar anestro.

Además, las recientes investigaciones también demuestran que el EC, desencadena la liberación de corticoides y estos a su vez inhiben la producción de GnRH, razón por la cual el desarrollo folicular y la ovulación se ven afectados, presentándose un anestro.

3.4 Dinámica folicular

La etapa de dinámica folicular es aquella en la cual el folículo antral lleva a cabo su proceso de desarrollo y regresión, hasta llegar a la fase de folículo dominante. Las hembras bovinas presentan entre 1 y 3 ondas foliculares, donde el folículo dominante se forma durante la última onda folicular (Ortega *et al.*, 2011). Como se ha explicado anteriormente las gonadotropinas, FSH y LH, son las principales hormonas involucradas en el crecimiento y desarrollo de los folículos antrales. Por lo tanto, el desarrollo folicular, se relaciona

estrechamente con las concentraciones circulantes de FSH (Figura 3), esta hormona produce un desarrollo sobre las células de granulosa aumentando a la par las concentraciones de la hormona LH (Ryan *et al*, 1999).

La dinámica folicular es un proceso conocido como foliculogénesis, durante este proceso las células de granulosa llevan a cabo su proliferación y su diferenciación, de igual manera las células de la teca llevan a cabo los mismos mecanismos (Ryan *et al*, 1999). Las células de granulosa son aquellas afectan directamente en el desarrollo y crecimiento de los ovocitos, los ovocitos se encuentran dentro de los folículos ováricos rodeado por varias capas de células de la granulosa. Las células de la teca a pesar de no estar en contacto directo con los ovocitos también influyen en su crecimiento y maduración (Hernández, 2016).

Las células de la teca realizan sus funciones en conjunto con las células de la granulosa, ya que las primeramente mencionadas estimulan la producción de andrógenos y estos a su vez son convertidos en estrógenos por las células de la granulosa (Hernández, 2016). El folículo ovárico es una estructura fundamental en el sistema reproductivo de la hembra bovina, ya que este, resguarda a los ovocitos, y provoca la secreción de hormonas esenciales para el mantenimiento del ciclo estral de la hembra, así como también regula parte del proceso del microambiente uterino adecuado para mantener la implantación (Ryan *et al*, 1999).

El proceso de foliculogénesis se realiza durante la etapa, prepuberal, anestro y primeros meses de gestación. Se estima que las vacas nacen con aproximadamente 200,000 folículos, de los cuales solo una pequeña parte de estos cumplirá sus funciones adecuadamente (Hernández, 2016). Actualmente existen controversias con el proceso regenerativo de los folículos no se sabe con exactitud si estos tienen la capacidad de regenerarse o no, (Findlay *et al*, 2009). Existen varias denominaciones para los folículos de acuerdo con el desarrollo que estos presenten (Figura 2); la fase denominada primordial se refiere a esa fase en la que la hembra bovina se encuentra en sus primeros meses de vida y los folículos se encuentran inactivos (Hafez, 2002).

Mientras que los folículos primarios y secundarios (Figura 2), son aquellos folículos que son activados sin embargo no tienen antro, esta fase es conocida como preantral, los folículos denominados terciarios son aquellos que ya cuentan con el antro formado, y su función es regida por el conjunto de gonadotropinas, esta etapa es conocida como antral (Hernández, 2016).

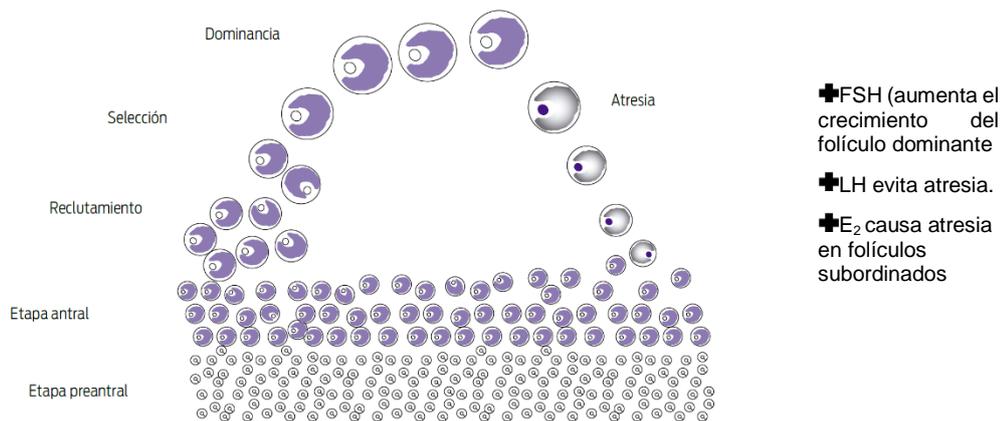


Figura 2.- Esquema simplificado del crecimiento folicular. En esta figura se puede observar que las concentraciones de FSH están estrechamente relacionadas con el crecimiento folicular, cada onda folicular se rige por elevadas concentraciones de FSH, de tal manera que comienzan a desarrollarse las tres etapas del crecimiento folicular; el reclutamiento donde de cinco a seis folículos desarrollan un tamaño superior \geq cuatro milímetros, seguido de esto ocurre la selección donde solo un folículo continúa su desarrollo (folículo dominante), finalmente se entra en la etapa de dominancia, durante esta etapa el folículo dominante evita la atresia por acción de la hormona LH, mientras secreta elevadas cantidades de estradiol causando atresia en folículos subordinados. El ciclo termina aproximadamente el día seis donde si el folículo dominante no ovula este se atresia, y se reinicia el ciclo (tomado y modificado de la obra de Hernández, 2016).

La duración total del crecimiento folicular se estima en aproximadamente 20 días, sin embargo, se ha demostrado que el desarrollo de los folículos hasta la fase terciaria no es dependiente únicamente de la influencia de gonadotropinas (Hafez, 2002).

La dinámica folicular se lleva a cabo mediante tres procesos; el reclutamiento, selección y la dominancia, los cuales serán brevemente descritos continuación.

En la etapa antral se lleva a cabo el desarrollo folicular a manera de oleadas u ondas y estas comienzan con un incremento de los niveles de la hormona

FSH, mediante estas ondas se produce el crecimiento de cinco a seis folículos de aproximadamente \geq cuatro milímetros, este proceso es denominado como reclutamiento, después de esta etapa ocurre la denominada selección (Figura 2), durante esta etapa solo un folículo aumenta su tamaño (folículo dominante), evita la atresia y se posiciona como el más apto para producir ovulación (Hernández, 2016).

Durante la etapa de selección el folículo dominante genera un aumento en las concentraciones de estrógenos e inhibina y como fue descrito anteriormente debido a la capacidad de retroalimentación negativa estas hormonas disminuyen la secreción de FSH, por lo tanto, causa atresia sobre los folículos subordinados, mientras el folículo dominante evita la atresia por acción de la LH (Hernández, 2016). El proceso mediante el cual el folículo efectúa como inhibidor sobre los folículos subordinados se conoce como dominancia (Figura 2) (Ortega *et al.*, 2011).

El folículo dominante se desarrolla con un mayor tamaño que el resto y además es responsable de una secreción considerable de estradiol, y adquiere capacidades diferentes al resto, donde este se desarrolla en un ambiente hormonal diferente a los demás folículos subordinados (Ortega *et al.*, 2011). De acuerdo con Hernández, (2016), se ha estimado que el folículo dominante continua su crecimiento hasta el día seis, donde si no cumple con su función de ovulación este sufre de atresia, provocando una reacción hormonal que reinicia la nueva oleada folicular (Figura 2 y 3).

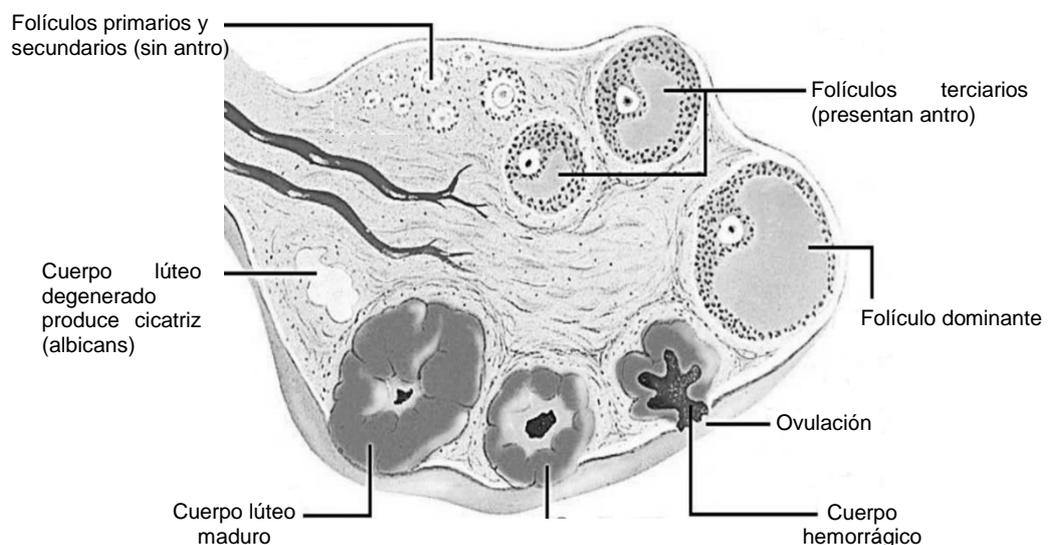


Figura 3.- Esquema simplificado del crecimiento del cuerpo lúteo. En esta figura se puede observar la formación de cuerpo hemorrágico la cual es resultado del rompimiento de las paredes del folículo dominante y permite la ovulación. Seguido de esto podemos observar la formación del CL inicial y el cuerpo lúteo maduro, conocidos comúnmente como cuerpo amarillo, finalmente se observa la regresión del CL, o lúteolisis proceso que produce una cicatriz denominada albicans (tomado y modificado de la obra de Della, 2016).

3.5 Desarrollo del cuerpo lúteo

Cuando el folículo dominante completa su ciclo, genera una liberación de estrógenos y estos a su vez causan la secreción de GnRH, provocando un incremento de principalmente de la LH y ocurre la ovulación (Hernández, 2016). De acuerdo con Ortega *et al.*, (2011) durante la ovulación, el folículo rompe sus paredes formándose un cuerpo hemorrágico, este puede ser observado por ultrasonido a partir del día uno del ciclo estral y aproximadamente el día tres ese cuerpo hemorrágico comienza a crecer y cambia su estructura formándose de color amarillo, a esta estructura se le denomina CL (Figura 3).

El CL es una glándula endocrina transitoria, la cual participa en múltiples procesos del sistema reproductivo, es la única glándula de regulación hormonal transitoria que secreta P_4 , entre sus principales funciones se encuentran; el reconocimiento y adhesión del blastocito, así como también se encarga de regular el mantenimiento de la gestación en sus primeros cinco meses (Ortega *et al.*, 2011). Como se mencionó anteriormente en la descripción del diestro, la secreción de P_4 , es indispensable para la supervivencia del cigoto, ya que esta hormona crea un microambiente óptimo para su desarrollo, así como también está relacionada en la producción de leche (Ortega *et al.*, 2011).

El CL típico de ciclo estral es conocido como *Corpus luteum spurium* y este alcanza su pico de producción de progesterona aproximadamente el día 3 y 12, el CL que generalmente se mantiene hasta aproximadamente el quinto

mes de gestación, después de esto la placenta es la encargada de suplir el mantenimiento de la gestación (Guaqueta, 2009).

El CL en una vaca puede llegar a medir aproximadamente entre 2 y 2.5 centímetros, este puede ser visualizado mediante ultrasonido o puede ser palpado rectalmente (Figura 3), este continua su crecimiento hasta el día 16 o 17 del ciclo estral, y en caso no haber gestación este comienza su regresión (Guaqueta, 2009).

A continuación, se realiza una breve descripción de su proceso de crecimiento y desarrollo en sus dos etapas o fases.

3.5.1 Luteinización.

La etapa de luteinización se lleva a cabo desde antes de la ovulación, durante la fase de preovulación, es decir antes del metaestro, donde por acción de la LH elevada se comienza dicha etapa. La ovulación se efectúa aproximadamente 30 horas después del pico preovulatorio de LH, dicha elevación de esta hormona se relaciona estrechamente con la secreción de enzimas proteolíticas en la pared folicular, las cuales provocan una lisis celular a continuación se producen contracciones de la teca exterior por acción de la hormona PGF2a y se produce una ruptura folicular y debido a esta ruptura un ovulo es liberado (Hernández, 2016).

Cuando ocurre la ovulación las células de la teca interna y de la granulosa que forman la estructura del folículo llevan a cabo una transformación conocida como luteinización, mediante la acción de la LH, al liberarse el ovulo las células se transforman; las células de la granulosa forman las células lutéales grandes y las células de la teca forman a las células lutéales pequeñas. Por lo tanto, en el proceso de luteinización se llevan a cabo cambios morfológicos, endocrinos y enzimáticos (Hernández, 2016).

3.5.2 Lúteolisis.

El proceso de lúteolisis es comúnmente conocido como regresión luteal, durante esta etapa se efectúa una degeneración de la estructura del CL (Figura 3), provocando a la par una decaída en los niveles de P₄. La hormona que induce esta regresión del CL es la PGF2a secretada por el útero la cual tiene acciones directas sobre el ovario, el transporte de esta hormona se

realiza mediante las venas uterinas hacia la arteria ovárica por un mecanismo contracorriente, este proceso generalmente se comienza el día 16 o 17 en el caso de las hembras bovinas (Hernández, 2016).

Los estrógenos secretados por el folículo dominante, causan una reacción en cadena generando el comienzo de la secreción de PGF2a, ya que estimulan la síntesis de receptores para oxitocina, la PGF2a se secreta mediante pulsos de entre seis a ocho horas, donde se considera que en promedio se requieren de cinco a seis episodios para que se lleve a cabo la lúteolisis este proceso determina el fin de la fase lútea y el inicio de la fase folicular (Hernández, 2016).

3.6 Descripción de la técnica de aspiración folicular transvaginal (OPU)

La fecundación *in vitro* se comenzó a utilizar en pequeños ensayos en bovinos en la década de los setenta, registrándose hasta 1980 el primer nacimiento de un ternero. Gracias al desarrollo de la fecundación *in vitro* surgió la técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU, Ovum Pick-Up) (Gonella *et al.*, 2013).

Esta técnica permite recolectar ovocitos inmaduros provenientes de vacas vivas o post mortem, en el caso de las primeras la aspiración se realiza mediante una guía conectada a un equipo de ultrasonografía, la cual se introduce de manera vaginal, esta guía de aguja se encuentra provista de una bomba al vacío, donde se realiza una punción en los folículos ováricos y se aspiran los ovocitos inmaduros (Ruiz, 2010).

Mientras que para los animales que por alguna razón terminan en defunción, se realiza mediante la obtención de sus ovarios, a los cuales se les realiza una punción mediante una guía de aguja conectada a una bomba al vacío (Ruiz, 2010). En ambos casos posteriormente se realiza, una selección de los ovocitos más aptos para su desarrollo, seguido de este procedimiento se realiza su maduración *in vitro* (MIV), después del proceso de maduración *in vitro* que tiene una duración de 18 a 24 horas, seguido de ello se realiza la fertilización (FIV) con semen sexado (Ruiz, 2010).

18 horas después del proceso de fertilización los presuntos cigotos se someten a un procedimiento de cultivo de embriones (CIV), continuando con todos los procesos de esta técnica se realiza la transferencia en fresco o bien, la preservación embrionaria, donde se han descrito dos métodos; vitrificación y criopreservación (Kimura y Matsuyama, 2014). Seguido de ello se sincroniza a las receptoras empleando un dispositivo intravaginal el cual libera progesterona de manera controlada (Zárate *et al.*, 2018).

En el caso de los embriones criopreservados, pueden almacenarse por un largo periodo de tiempo y mantener su crecimiento frenado, en el mismo estado. Finalmente se realiza la transferencia del embrión estando en su día siete de crecimiento, (mórulas o blastocitos) mientras que la hembra receptora también se encuentra en su día siete de sincronización. El diagnóstico de gestación se puede realizar a los 60 días, utilizando el mismo equipo de ultrasonido (Ruiz, 2010).

3.6.1 Aspiración folicular transvaginal.

Para realizar este procedimiento, primero se procede a esterilizar el lugar de trabajo, y se prepararan todos los materiales a usar (bomba de aspiración, ecógrafo, transductor, regulador de energía y la extensión. Posteriormente se inmoviliza al animal dentro de una prensa, comúnmente conocida como brete y se aplica anestesia vía epidural. Se procede a limpiar el recto al igual que la vulva y el área perineal (Corredor y Páez, 2012).

Continuando con este proceso para la visualización de los folículos ováricos se emplea un ecógrafo, equipado con un transductor vaginal, donde se coloca la guía de aspiración (Corredor y Páez, 2012). Se realiza una palpación mediante el recto al mismo tiempo que se visualizan las estructuras mediante el ecógrafo transvaginal, esto para poder diferenciar los folículos ováricos de manera adecuada (Anaya *et al.*, 2018).

Posteriormente una vez lista la donadora, se lubrica con gel la guía y se introduce dentro de la vagina con ayuda de la palpación rectal, se posiciona la guía frente a los ovarios para tener visualización y poder llevar a cabo la punción, finalmente se procede a aspirar todos los folículos mayores a 2mm que se encuentren en ambos ovarios (Corredor y Páez, 2012).

3.6.2 Selección de ovocitos.

Mediante el proceso de aspiración transvaginal se obtienen los CCOs (complejos de cumulo-ovocitos). Posteriormente en el proceso de selección, el tubo de centrifugado donde se alojan los ovocitos aspirados, generalmente es llevado a un laboratorio montado en campo. Para llevar a cabo el procedimiento de selección de ovocitos, primero se realizan una serie de lavados, donde se filtran los CCOs por medio de filtros plásticos para eliminar los restos de sangre, hasta que la muestra quede transparente. El sedimento resultante es pasado a cajas Petri y se coloca en un estereoscopio, de esta manera se procede a su conteo y selección (Marquant-Le *et al.*, 1989).

Los ovocitos deben de ser seleccionados, ya que solo algunos cuentan con la capacidad de reiniciar su ciclo de meiosis y poder ser fertilizados *in vitro*, los ovocitos son clasificados por su morfología; diámetro, contenido celular, cantidad de capas de células del cúmulo y pigmentaciones dentro del núcleo, se ha descrito que los de mejor calidad pertenecen a las categorías I, II y III (Shioya *et al.*, 1988; Ruiz, 2010).

A continuación, se realiza una breve descripción de las categorías de ovocitos de acuerdo con la clasificación descrita por Shioya *et al.*, (1988) y Stringfellow, (1998).

Categoría I: El cúmulo de la célula presenta cuatro capas compactas en la periferia de su superficie, mientras que el citoplasma se presenta de manera homogénea, se observa llena totalmente el espacio delimitado por la zona pelúcida.

Categoría II: El cúmulo de la célula presenta tres capas compactas en la periferia de su superficie. En esta clasificación el citoplasma ya no se observa tan homogéneo como la categoría 1, se observa una periferia clara y un centro oscuro, sin embargo, se observa totalmente lleno el espacio delimitado por la zona pelúcida.

Categoría III: La superficie de la célula se encuentra rodeada por cúmulo expandido, a partir de esta categoría el citoplasma se observa fragmentado y no llena totalmente el espacio delimitado por la zona pelúcida.

Categoría VI: Los ovocitos se encuentran desnudos y tienen presencia de citoplasma fragmentado.

Por lo anterior los ovocitos que presentan más de tres capas compactas de cúmulus y citoplasma homogéneo son categorizados como los más aptos para el procedimiento *in vitro*, de tal manera que tienen la capacidad de reiniciar su ciclo de meiosis

3.6.3 Maduración de ovocitos (MIV).

El proceso de MIV se lleva a cabo después de la selección de los ovocitos, en estos sus estructuras se encuentran poco desarrollados en fases iniciales, por lo tanto, el objetivo del proceso de maduración es permitirle al ovocito reanudar la meiosis, para adquirir la capacidad citoplasmática y genética para ser aptos para el resto de los procedimientos secuenciales. Si las condiciones del proceso de selección y maduración son las adecuadas el 95% de los ovocitos alcanzara la maduración (Cruz y Lopera, 2020).

Cuando el proceso se lleva a cabo *in vitro*, los ovocitos previamente seleccionados, son lavados dos o tres veces con medio de lavaje, y se colocan en tubos con medio de maduración como el M-TMC-199 a estos medios de maduración generalmente se les adiciona suero fetal bovino, FSH y estradiol. Se incuban 24 horas en un ambiente controlado de 5% de CO² y 100% de humedad, a 38°C (Soto *et al.*, 2019).

Los ovocitos se incuban durante 24 horas, estos completan su maduración hasta alcanzar el estadio de metafase II de la meiosis, dentro de las características que se pueden observar para reconocer la viabilidad de los ovocitos que han llevado a cabo su proceso de maduración de manera adecuada se encuentran; la presencia del primer corpúsculo polar en el sitio perivitelino, desaparición de la membrana nuclear y cúmulus expandido, cuando se cumplen estas características el ovocito se encuentra preparado para su fertilización (Landínez *et al.*, 2010).



Figura 4.- Imagen tomada durante la realización del presente estudio. En esta imagen se representa un ovocito maduro, donde las células de cúmulus se encuentran expandidas, se observa una disolución de la membrana nuclear y el primer corpúsculo polar, por lo tanto, el ovocito se encuentra en su etapa de metafase II de la meiosis y es viable para su fertilización *in vitro*.

3.6.4 Fertilización In Vitro (FIV).

Durante esta técnica se realiza una manipulación de gametos masculinos y femeninos, cuando los ovocitos han alcanzado su proceso de maduración, se procede a la manipulación del semen sexado, es de gran importancia este proceso ya que los espermatozoides deben ser seleccionados, entre las capacidades tomadas en cuenta se encuentra; mayor motilidad y mejor condición, además de esto se les debe de practicar una serie de lavados para eliminar sustancias no deseadas como crioprotectores (Cruz y Lopera, 2020).

Actualmente se desempeñan diversas técnicas para la selección de los espermatozoides; como la denominada Swin-Up que consiste en medir su capacidad de migración, y las realizadas a través de centrifugaciones y lavados como el Percoll y el Bovipure, por medio de las técnicas anteriormente descritas se logra el mismo objetivo seleccionar los espermatozoides motiles (Cruz y Lopera, 2020).

Al respecto una de las técnicas más empleadas y con buenos resultados es la de Percoll, este proceso se lleva a cabo mediante centrifugación, de tal manera que los espermatozoides que llegan al fondo del tubo y forman el pellet, son motiles y viables, y los que no son aptos se quedan en la parte superior del tubo, esta técnica es efectiva para eliminar plasma seminal,

espermatozoides no motiles, diluyentes y crioprotectores (Cruz y Lopera, 2020).

3.6.5 Cultivo de embriones (CIV).

Después de la fertilización se lleva a cabo el cultivo de embriones, para comenzar con este procedimiento las células del cúmulus son separadas de los supuestos cigotos, mediante pipeteo repetido y se procede a su clasificación, a continuación, los más aptos se colocan en un medio de cultivo (Cruz y Lopera, 2020). Su clasificación se basa en la presencia de un citoplasma adecuado y se rechazan aquellos cigotos degenerados (Cruz y Lopera, 2020).

Mediante la incubación de los supuestos cigotos en el medio de cultivo, estos se desarrollan hasta su día 7, y por ello es importante que estos medios de cultivo *in vitro* sean adecuados, ya que deben proporcionar condiciones similares a las *in vivo*, algunos de los medios de cultivo más empleados en la actualidad son; TCM199, KSOM, CR1aa y SOF (Cruz y Lopera, 2020). Estos medios de cultivo se componen de sales inorgánicas, vitaminas, glucosa, piruvato de sodio, timidina y fuentes proteicas (Cruz y Lopera, 2020).

Al respecto el medio de cultivo SOF optimiza una respuesta positiva para desarrollo embrionario, para emplear este medio de cultivo este debe de suplementarse hialuronidasa y para finalizar este procedimiento se incuban a 38°C con 5% CO² durante siete días, hasta alcanzar el estado de mórula o blastocito (Ponce y Rosero, 2020).

La eficiencia en las tasas de gestación de las receptoras depende de la calidad embrionaria que se utilice, al respecto un reciente estudio publicado por Kimura y Matsuyama (2014) muestra que un factor determinante en el éxito de las tasas de gestación obtenidas depende principalmente de la etapa en la que se encuentre el embrión transferido (Kimura y Matsuyama, 2014).

Los diferentes estadios del desarrollo embrionario se describen brevemente a continuación comenzando con las etapas denominadas mórulas, utilizando el código de la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS) y Stringfellow y Siedel, (1998), estos son representados por la figura 5

A partir del día dos después de cultivar los embriones estos comienzan a producir divisiones mitóticas las cuales incrementan su número de células. Estas células se les denomina blastómeras.

1.- Zigoto (Figura 4).

2.- Día de desarrollo dos-cinco, las células del embrión (Blastómeros) son de 2 a 12 (Figura 4).

3.- Día de desarrollo cinco-seis 6, las células se forman a manera de masa que asemeja una mora, este grado de desarrollo es denominado mórula temprana (Figura 4).

4.- Día de desarrollo seis, las células del embrión se encuentran de manera más compacta y es complicado contarlas, pero los blastómeros ya ocupan el 60% del embrión. Esta etapa de desarrollo es denominada morúla (Figura 4)

Cuando comienza a formarse una cavidad dentro de los blastómeros, esta cavidad recibe el nombre de blastócele, entonces se le denomina a toda la estructura blastocito las cuales son descritas a continuación de acuerdo con el manual del IETS (Figura 4)

5.- Día de desarrollo siete, en esta etapa se forma el blastócele, las células del embrión ocupan el 70% del interior del embrión. Esta etapa de desarrollo es conocida como Blastocito temprano (Figura 4).

6.- Día de desarrollo siete-ocho, en esta etapa se puede observar una diferencia entre el trofoectodermo externo y la masa celular interna (blastómeros), esta etapa es denominada Blastocito.

7.- Día de desarrollo ocho-nueve, la zona pelúcida se adelgaza un tercio de grosor anteriormente presente, en esta etapa la mayoría de los embriones pueden encontrarse colapsados. Esta etapa es mejor conocida como Blastocito expandido (Figura 4).

8.- Día de desarrollo nueve, la mayoría de los embriones se observan fuera de la zona pelúcida y otros se pueden observar en proceso de eclosión, en esta etapa al igual que la anterior puede observarse los blastocitos colapsados y otros sin colapsar. Esta etapa es comúnmente conocida como blastocito eclosionado (Figura 4).

9.- Día de desarrollo nueve-diez, la mayoría de los blastocitos en esta etapa ya no son viables para su transferencia, esta etapa es denominada blastocito eclosionado expandido (Figura 4).

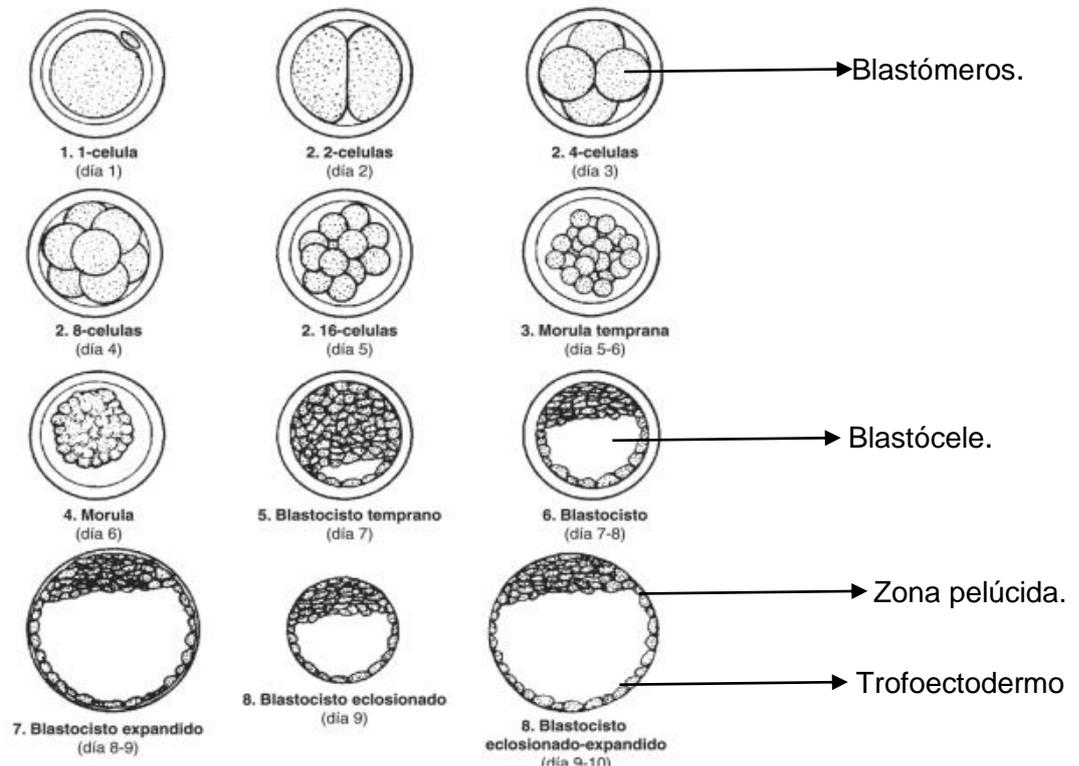


Figura 5.- Diferentes etapas del desarrollo embrionario. Se observan las estructuras; blastocele (la cavidad interna), masa celular interna (también denominados blastómeros son un pequeño grupo de células a partir de las cuales se originará el feto), la zona pelúcida (capa externa que rodea al embrión), el trofoectodermo (capa de células externa que rodean al blastocito y darán lugar a la placenta). Figura tomada y modificada de Stringfellow y Siedel, (1998).

Además, de la clasificación de acuerdo con su desarrollo los embriones también se categorizan de acuerdo con su calidad, a continuación, se describen brevemente dichas categorías, utilizando el código de la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS) y de acuerdo con Stringfellow y Siedel, (1998).

Los embriones se clasifican de acuerdo con sus características morfológicas, del uno-cuatro o de A-D, donde la mejor calidad es la uno u A y para ser transferidos, los más viables son los grados uno-tres o bien A-C. Los embriones se clasificarán en función de la valoración de tres aspectos: El grado de expansión, el estado de la masa celular interna y el estado del

trofoectodermo. Por lo anterior se considera que un embrión es de buena calidad si se presentan los siguientes criterios; embrión esférico con blastómeros de tamaño y color uniformes y zona pelúcida intacta, embrioblastos uniformes y localizados, blastocelos bien formados y células trofoectodérmicas periféricas planas.

-Grado 1: Embrión de óptima calidad. Con máxima capacidad de implantación. En este grado el embrión es esférico, con blastómeros homogéneos en su tamaño y color y el estado del embrión es adecuado con su estadio de desarrollo, las posibles irregularidades presentes deben de ser escasas y la zona pelúcida debe de ser homogénea.

-Categoría 2: Embrión de buena calidad. Con elevada capacidad de implantación. Se evalúan los criterios morfológicos en los blastómeros, la zona pelúcida, blastocelos adecuados y las irregularidades presentes no deben de ser más de la mitad de toda la estructura del embrión.

-Categoría 3: Embrión regular. Con bajas posibilidades de implantación. En este grado las irregularidades de su estructura son mayores, la forma del embrión es irregular, la masa embrionaria presenta diferentes tamaños, color y densidad.

-Categoría 4: Embrión de mala calidad. Con muy pocas posibilidades de implantación. Se trata de un grado embrionario degenerados y por lo tanto no viables.

3.6.6 Criopreservación embrionaria.

Actualmente la producción de embriones *in vitro* es una herramienta que permite acelerar el crecimiento genético de un determinado sistema productivo de embriones, sin embargo, un problema constantemente presentado por los productores es que no cuentan con el número adecuado de receptoras para recibir un embrión (Córdova *et al.*, 2015). Por lo anterior desde hace 43 años se ha implementado la preservación de embriones a bajas temperaturas, esta técnica permite almacenar embriones por largos periodos de tiempo, hasta que se cuente con los animales necesarios para llevar a cabo la transferencia (Córdova *et al.*, 2015).

La criopreservación es un método de preservación embrionaria, el cual se mantiene el embrión en un estado de desarrollo suspendido, a bajas temperaturas, frenando los procesos biológicos; metabolismo, respiración, actividad enzimática y división de blastómeros. Lo descrito anteriormente no compromete la capacidad de desarrollo del embrión y este puede ser activado en el momento necesario (Cabrera y Fernández, 2006). A pesar de que la criopreservación parece no afectar la capacidad de desarrollo del embrión, se ha reportado que la tasa de gestación de embriones implementando esta técnica es de 30 % a 40 %, mientras que cuando se transfieren embriones en fresco la tasa de gestación es de 60 % (Córdova *et al.*, 2015). Esto podría deberse a que el éxito de esta técnica depende de tres criterios; creación de hielo dentro del embrión, deshidratación y degeneraciones en el embrión producidas por crioprotectores (Córdova *et al.*, 2015).

El procedimiento de congelamiento de embriones se realiza mediante un proceso progresivo, los embriones se colocan en placas con una solución de congelación y se comienza este procedimiento durante 25 minutos a 22 °C, posteriormente se congelan a -6 °C, 10 minutos y a partir de este momento la temperatura se comienza a disminuir a razón de 0.5 °C por minuto, hasta que finalmente estos llegan a una temperatura de -32 °C, al final estos se almacenan en nitrógeno líquido a -196 °C, hasta ser necesaria su activación, donde para emplear un embrión estos deben de ser calentados también de manera progresiva (Zárate *et al.*, 2018). El tiempo que los embriones pueden durar congelados no ha sido conocido con exactitud, sin embargo, se teoriza que aquellos que son almacenados en nitrógeno líquido, pueden tener una duración de hasta mil años (Cabrera y Fernández, 2006).

3.6.7 Sincronización de receptoras.

Para que un embrión sea transferido a una receptora, estas deben ser sincronizadas utilizando diferentes técnicas como; dispositivos intravaginales e implantes subcutáneos. Actualmente los más empleados son los dispositivos intravaginales que liberan progesterona, estradiol y prostaglandina de manera controlada (Bó *et al.*, 2013).

La progesterona liberada por el dispositivo intravaginal, posee la acción de suprimir el crecimiento del folículo dominante y evita su ovulación (Callejas, 2005). El benzoato de estradiol generalmente es aplicado al inicio de la sincronización a manera de inyección, este tiene como objetivo producir una regresión folicular y sincronizar la emergencia de una nueva onda folicular que se presenta 4 días después de su aplicación (Bó *et al.*, 2013). Al retirar el dispositivo intravaginal que libera progesterona el día 7 u 8 se aplica una dosis de prostaglandina o cipionato de estradiol y estos provocan una regresión del CL. El objetivo de esta sincronización es generar la ovulación y la presencia del CL, que se encarga de mantener la gestación a través de la liberación de hormonas que produce. (Callejas, 2005).

3.6.8 Transferencia de embriones y diagnóstico de gestación.

El embrión seleccionado es transferido cuando el productor cuenta con las receptoras necesarias, en el día siete de desarrollo embrionario y de la misma manera la receptora se encuentra en su día siete de sincronización (Robertson y Nelson, 2010). Después de retirar el dispositivo intravaginal se realiza la transferencia del embrión (Robertson y Nelson, 2010).

Para este procedimiento primero se realiza una revisión mediante ultrasonido, para ubicar al CL más grande, ya sea en el ovario izquierdo o derecho, posteriormente se descongela al embrión seleccionado a 38 °C por 40 segundos, y se carga en una pajuela de embriones, donde habitualmente solo se coloca un embrión, pero a consideración del productor y del técnico que realice la operación, se pueden colocar dos, la pajuela se coloca en un dispositivo denominado pistola de transferencia y esta se introduce de manera vaginal en el cureno uterino de lado donde se encuentra la presencia del CL más apto (con un diámetro de entre 18 y 23 mm) (Naranjo *et al.*, 2016; Anaya *et al.*, 2017). El diagnóstico de gestación puede realizarse a los 30, 60 o 90 días después de la transferencia, para ello se implementa ultrasonografía para reconocer las estructuras (Naranjo *et al.*, 2016). Se ha documentado que entre más grande sea el tamaño del CL, mayor será la producción de progesterona, y dicha hormona es indispensable para la gestación (Anaya *et al.*, 2017).

3.7 Criterios para seleccionar una hembra donante.

La selección de las donantes es el primer paso para realizar todo el proceso de OPU, la importancia de estas hembras es que aportaran la genética del embrión y posteriormente del ternero, por lo tanto, estas deben de contar con un adecuado linaje, con un registro genealógico de tal manera que se pueda conocer sus características de producción de carne o leche, el estado de salud (libre de enfermedades como brúcela, luecosis,, ibr, dvb, leptospira tricomoniasis entre otros) sus capacidades reproductivas (ciclos estrales regulares) y docilidad (Peña *et al.*, 2001).

Las donadoras al igual que las receptoras deben contar con adecuado estado nutricional no deben estar bajas de peso, pero tampoco obesas. Generalmente se escogen animales con un optimas capacidades reproductivas, no obstante, también se puede trabajar en hembras con problemas en su sistema reproductivo pero las probabilidades de éxito serán menores (Peña *et al.*, 2001).

Es recomendable que si se trata de una hembra que tiene un ternero este se encuentre detestado, ya que la presencia del ternero y el amamantamiento pueden provocar que las hembras no ciclen, es habitual observar hembras bovinas que no ciclan los dos primeros meses después de nacer el ternero, por lo tanto, es preferible que las donadoras no se encuentren en periodos de lactancia (Peña *et al.*, 2001).

3.8 Criterios para la selección de hembras receptoras.

La selección de las receptoras forma parte esencial de la obtención de resultados positivos con la técnica OPU, estas hembras llevaran a cabo la tarea de prestar su vientre y mantener toda la gestación, por lo tanto, deben de encontrarse en condiciones adecuadas para recibir a un embrión, mantener la gestación, tener un parto exitoso, y consecuentemente deberá de alimentar a su ternero adecuadamente (Ariza *et al.*, 2006).

Por lo anterior debe de encontrarse en un estado óptimo de salud y con una adecuada producción láctea. El tamaño de la receptora debe de estar relacionado con el tamaño del embrión que se le transferirá. La edad de la

receptora es determinante, sin embargo, este dato difiere mucho de autor a autor, en el caso de las vaquillas algunos autores refieren que la edad adecuada debe de ser de 18 a 24 meses y deben de tener un peso superior a 300 kg (Ariza *et al.*, 2006).

Al respecto otro factor que presenta controversia es si es más adecuada una receptora nulípara o una vaca con una o varias crías, donde se ha destacado que las nulíparas presentan tasas de gestación más elevadas, sin embargo, al desconocerse su historial reproductivo estas podrían reflejar resultados negativos, ya que podrían presentar problemas durante la gestación, parto y alimentación (Ariza *et al.*, 2006).

Mientras que utilizar una vaca con un historial reproductivo conocido, permite saber los posibles resultados presentados a futuro. Por otro lado, la alimentación de una receptora es vital para la obtención en el éxito de la gestación ya que la hembra deberá proporcionar los nutrientes necesarios para que se exprese el potencial genético del ternero, se deben evitar vacas con reservas de grasas alta o con deficiencias nutricionales (Ariza *et al.*, 2006).

Otro factor importante es seleccionar receptoras del mismo hato ya que estas portarán inmunidad a virus y bacterias presentes de ese sistema de producción, y estos beneficios serán pasados a sus crías. Sin embargo, la genética del embrión y posible ternero no tendrá nada que ver con la receptora (Ariza *et al.*, 2006).

Además, el técnico a cargo deberá realizar un chequeo mediante ultrasonografía y palpación para comprobar que las receptoras se encuentren ciclando, su aparato reproductivo debe de ser sano verificando las condiciones uterinas, ovarios, cérvix y cuernos (Ariza *et al.*, 2006).

3.9 Beneficios de la técnica de aspiración folicular transvaginal (OPU)

Actualmente se ha mencionado en diferentes investigaciones que el empleo de la técnica OPU tiene grandes beneficios para los productores de vacas, con dicha técnica se disminuye el intervalo de tiempo entre generaciones de

interés genético, se pueden obtener hasta 50 terneros de una donante de alta genética anualmente (Ruiz, 2010; García *et al.*, 2020).

En comparación con otras técnicas de biotecnología reproductiva como la superovulación, la OPU ofrece una mayor eficiencia en cuanto a los intervalos de tiempo, debido a que se pueden realizar hasta dos sesiones de aspiración por semana en un animal sin descanso durante un periodo de tres a seis meses, de esta manera se permite obtener una eficiencia tres o cuatro veces mayor en comparación con la técnica de superovulación (Alvarado *et al.*, 2016).

Al respecto otro autor que menciona los beneficios de esta técnica es Ruiz, (2010), refiere que la OPU puede ser usada en vacas viejas o jóvenes, en vacas con problemas de fertilidad o que no responden a tratamientos hormonales, e incluso en vacas que se encuentran dentro del primer tercio de gestación (Ruiz, 2010).

Al respecto también se puede incrementar la variabilidad genética, con un mayor rendimiento de semen, según las necesidades de un productor, ya que de una sesión de aspiración de una donadora se pueden fecundar los ovocitos con diferentes toros, o se pueden fecundar los ovocitos aspirados de diferentes donadoras, así como también esta técnica permite elegir el sexo del ganado producido ya que se implementa semen sexado (Samaniego, 2017; Larocca y Filipiak, 2017).

La siguiente lista de beneficios o ventajas de la técnica se describe de acuerdo con las consultas de literatura de Ruiz, (2010) y Gonella *et al.*, (2013).

- Aumento exponencial de la población de crías de un hato bovino.

- Mayor rendimiento de semen.

- Posibilidad de un mayor aprovechamiento de la vida reproductiva de animales de interés genético, con patologías (tuberculosis, brucelosis, leucosis), inmaduros o viejos e incluso post partem.

- Posibilidad de fertilizar ovocitos de una sola aspiración, con semen sexado y con diferentes toros.

-No se requiere del uso indiscriminado de hormonas (gonadotropinas) para sincronizar a las donadoras.

-La técnica puede ser utilizada en hembras con hasta 120 días de gestación.

-Posibilidad de un mayor aprovechamiento de las hembras que son utilizadas como receptoras.

-Los ovocitos pueden ser aspirados hasta dos veces por semana durante cinco o seis meses continuos, sin comprometer el adecuado funcionamiento de las estructuras fisiológicas del animal.

-Posibilidad de obtención de beneficios a largo plazo, debido a la selección artificial de los animales del hato estos tendrán una mayor producción y de mejor calidad, así como también se obtendrán animales más sanos.

3.10 Desventajas de la técnica OPU

A pesar de los grandes beneficios de la técnica Ruiz, (2010), reporto que varios factores pueden afectar en la eficiencia de producción de crías; el conocimiento del personal, el equipo utilizado, los medios de maduración, fertilización y cultivo empleados, o incluso factores biológicos del animal donante y la alta inversión pueden limitar una respuesta positiva de la técnica (Ruiz, 2010).

3.11 Factores ambientales relacionados con la reproducción de las hembras del ganado bovino.

3.11.1 *Cambio climático.*

En los últimos años a nivel mundial se ha registrado un aumento en las temperaturas ambientales, estos cambios representan una grave problemática en la actualidad ya que los efectos negativos dañan las actividades económicas, sociales e incluso políticas del mundo (SEMARNART, 2020). De acuerdo con los registros del 1996 al 2011 realizados por la organización meteorológica mundial se encontró que se reportaron los 13 años más calurosos a nivel mundial (OMM, 2011).

En México desde 1960 a 2012 la temperatura media anual ha incrementado en un 0.85 °C (SEMARNART, 2020). Destacando los registros realizados a partir de 2006, ya que a partir de este año los datos en todo el territorio mexicano han mostrado un incremento de la temperatura promedio de más de medio grado centígrado, por arriba de los registros históricos que datan desde 1981, lo que muestra una anomalía de la temperatura media anual (CONAGUA, 2020).

En México también se ha registrado una mayor prolongación de las altas temperaturas, por lo tanto, se ha observado un cambio en las estaciones anteriormente conocidas en todo el territorio (CONAGUA, 2020). Un estudio aplicado para la Comarca Lagunera durante 2007, realizó un análisis de los registros de las temperaturas máximas y mínimas desde el 1975 hasta el 2006, donde se encontró un incremento de las temperaturas medias anuales, máxima de 0.42 °C y mínimas de 0.8 °C (Sánchez *et al.*, 2007).

3.11.2 Efectos de estrés calórico en el sistema reproductivo del ganado bovino de leche.

El reciente aumento de las temperaturas en el territorio del país (CONAGUA, 2020), tiene efectos negativos en el adecuado funcionamiento de los procesos fisiológicos del ganado lechero, estos cambios fisiológicos tienen repercusiones principalmente en los procesos reproductivos de los animales (Polsky y Keyserlingk, 2017). Algunos estudios han reportado que las tasas de gestación y el desarrollo embrionario se ven perjudicados por factores externos del medio ambiente (Lozano *et al.*, 2005).

En bovinos al ser animales homeotérmicos pueden mantener su temperatura corporal dentro de ciertos límites fisiológicos denominados umbral de confort o bienestar térmico, cuando estos límites se exceden el animal es incapaz de disipar el calor de su cuerpo hacia el exterior para mantener un equilibrio interno, produciendo estrés calórico (EC) (Vélez y Uribe, 2010).

El EC es la incapacidad de un organismo para hacer frente a su entorno, es un efecto negativo acumulativo, donde se genera una reacción fisiológica la cual es proporcional a la intensidad aplicada por el ambiente térmico (Ríos *et*

al., 2013). Por lo anterior el organismo de una vaca al tratar de mantener un equilibrio fisiológico, desencadena un sinnúmero de reacciones bioquímicas y procesos fisiológicos relacionados con el metabolismo, donde los efectos negativos pueden afectar la salud y el rendimiento reproductivo (Cunningham y Klein, 2014).

El EC en ganado bovino se presenta principalmente por las altas temperaturas del aire, así como su escaso movimiento, la alta humedad y temperatura ambiental, así como la alta radiación solar (Polsky y Keyserlingk, 2017). Por lo anterior se ha desarrollado un índice denominado (ITH), índice de temperatura y humedad el cual es implementado para medir los rangos del estrés calórico que se puede presentar (López *et al.*, 2016). El ITH, se divide en rangos indicadores, que incorpora los efectos de la temperatura ambiental con la humedad relativa. El ITH <71 se considera zona de confort térmico, de 72 a 78 se considera EC leve, de 79 a 88 como EC severo y superior a 89 como EC muy severo (López *et al.*, 2016).

A treves de varias investigaciones se han destacado los efectos del EC en hembras bovinas, sobre la capacidad reproductiva; uno de estos factores ocurre en el sistema neuroendocrino, a través del hipotálamo y la hipófisis, esto ocurre a través de receptores cutáneos en conjunción con el sistema nervioso central (Castaño *et al.*, 2014). Cuando el organismo se encuentra fuera de su rango de confort, el sistema endocrino se ve afectado, generando mecanismos fisiológicos que comprometen el adecuado funcionamiento del sistema reproductivo, en un esfuerzo del organismo bovino por mantener la homeostasis (Castaño *et al.*, 2014).

Por lo anterior se ha descrito que las condiciones ambientales que rodean a las vacas, son de gran importancia en los procesos reproductivos, ya que afectan al sistema endocrino, se sabe que los efectos negativos repercuten en la capacidad de implantación de un embrión, así como en su desarrollo (Castaño *et al.*, 2014). Al respecto de acuerdo con el conocimiento obtenido a través diversos autores, se ha determinado que las subespecies pertenecientes a *Bos Taurus* presentan capacidades adaptativas a altas temperaturas y alta humedad relativa, inferiores a las conocidas para las subespecies pertenecientes a *Bos Indicus* (De Rensis, 2017).

3.12 Principales factores que afectan la capacidad de implantación de un embrión proveniente de OPU en receptoras Holstein.

Actualmente se han intensificado los estudios sobre la producción *in vitro* de embriones, mediante OPU, enfocándose principalmente en la hembra donante de embriones, teniendo como justificación, que al ser la descendencia genética selectiva es de gran importancia (Quispe *et al.*, 2015). Por ejemplo, se han desarrollado sinnúmero de protocolos de sincronización previos a la aspiración folicular, para tratar de obtener poblaciones de ovocitos de mejor calidad y en mejor cantidad (Vásquez, 2018). Además, se ha investigado también la correcta selección y clasificación de los ovocitos, así como también técnicas de preservación de embriones (Duica *et al.*, 2007).

Sin embargo, después de realizar la transferencia de un embrión a una hembra receptora, existen factores que afectan la eficiencia de esta técnica, estos factores están relacionados a todo el ambiente que va a rodear al embrión que se alojará en el útero de la receptora, tanto factores fisiológicos de animal, o factores externos del animal como el medio ambiente. Si las condiciones son adecuadas se obtendrán resultados positivos permitiendo el adecuado desarrollo del embrión. Por lo anterior la selección de la receptora sus debidos cuidados y los factores externos son determinantes para producir buenos resultados (Duica *et al.*, 2007).

Otros factores que pueden afectar la eficiencia de una receptora son; deficiencias nutricionales, de manejo, sanitarias, la ubicación y tamaño del cuerpo lúteo, así como la edad y el número de partos, (Oyuela y Jiménez, 2010; Duica *et al.*, 2007).

Una reciente investigación donde se implementó una técnica reproductiva denominada inseminación artificial se registró que con un aumento de temperatura rectal de 0.20 °C se detuvo el 90 % del desarrollo de los embriones (Larrosa, 2021). Actualmente se sabe que los efectos del EC en un embrión que es trasferido son más susceptibles a ser afectados negativamente los primeros 7 días después de la concepción (Larrosa, 2021).

Ha sido descrito que los primero tres días de desarrollo de un embrión son los más delicados, ya que los embriones se encuentran muy vulnerables a ser

afectados negativamente por factores externos como el EC (Herradón *et al.*, 2007). En programas de aspiración folicular las tasas de gestación se han observado superiores a otras técnicas como inseminación artificial ante condiciones de estrés calórico (Sartori *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2006).

Lo anteriormente expuesto podría deberse a que en la técnica OPU cuando un embrión es transferido al útero de una receptora se encuentra en su día 7 de desarrollo (Robertson y Nelson, 2010), por lo cual su etapa de desarrollo se encuentra más apta para resistir los efectos del EC. No obstante, es de gran importancia conocer cuáles son las repercusiones negativas sobre las tasas de implantación y desarrollo de un embrión con la técnica OPU en ganado Holstein, para poder desarrollar estrategias para reducir la mortalidad de las tasas de gestación (Sartori *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2006).

3.13 Balance término de bovinos

Los rumiantes son mamíferos homeotermos, este concepto se refiere a aquellos animales que tienen la capacidad de controlar su temperatura corporal, dentro de ciertos límites dependiendo de su genética, dichos límites son de gran importancia ya que, dentro de estos, se pueden llevar a cabo los diferentes procesos fisiológicos de manera adecuada. Para poder mantener estos límites el organismo de los animales requiere perder o ganar calor del medioambiente externo, a tal proceso se le denomina balance térmico (Arias *et al.*, 2008).

El balance térmico se divide en dos procesos; la transmisión mecanismo en el cual se disipa el 75% del calor corporal, mediante los sistemas de radiación, conducción y convección, mientras que la vaporización es responsable de liberar el 25% del calor corporal, mediante los sistemas de jadeo, sudoración y expiración, no obstante en los bovinos el mecanismo de sudoración es deficiente comparado con otras especies de mamíferos, al igual que su sistema de excreción mediante heces y orina (Aldrete *et al.*, 2014).

En bovinos productores de leche, cuando su temperatura corporal interna se sale de los límites en los cuales pueden llevar a cabo sus funciones vitales normales rangos que se encuentra entre los 37,8°C y 40°C el calor se disipa

por cuatro vías principales; radiación, convección, conducción y evaporación (Arias *et al.*, 2008). Dichos factores se describen brevemente a continuación.

Radiación: la radiación es el proceso de disipación de calor en el cual el organismo del animal elimina el calor a través de rayos infrarrojos, que son ondas electromagnéticas, es decir se realiza un flujo calórico entre estas ondas calóricas y el medio exterior (Arias *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2021).

Convección: se refiere a la transferencia de calor a través del movimiento del cuerpo del animal, de tal manera que el aire que se encuentra circulante al cuerpo del animal disipa la carga de calor hacia el exterior (Arias *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2021).

Conducción: En este proceso el organismo del animal transmite su calor desde su interior de su cuerpo hasta la piel, de esta manera a través de la piel el calor puede ser transferido hacia un medio exterior, por ejemplo, si el animal está en contacto con una superficie que se encuentra a una temperatura inferior a la de la piel, el calor puede ser transferido hacia esta superficie (Arias *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2021).

Evaporación: La pérdida de calor por evaporación se realiza en forma de transformación de energía térmica en vapor de agua, el cual se contiene sobre la superficie del animal y ayuda a disipar el calor del organismo bovino. Este proceso se lleva a cabo a través de la respiración, sudoración, con o sin participación de las glándulas sudoríparas ya que se puede realizar una difusión de agua subcutánea. En este proceso la pérdida de calor también puede ser realizada por salivación y orina (Arias *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2021).

3.14 Situación productiva de leche en el país

En los últimos años se ha observado un crecimiento de la población mexicana, así como una modificación de sus hábitos alimenticios, razón que está estrechamente relacionada con un aumento en el consumo de productos lácteos (Cavalloti *et al.*, 2019) durante 2018 el INEGI registro que en cada hogar mexicano el gasto realizado para subsistir represento un 10% en consumo de leche y sus derivados, siendo así los principales productos

consumidos para cubrir las demandas alimentarias y nutricionales de dicha población (INEGI, 2018; Cavalloti *et al.*, 2019).

No obstante, de acuerdo con el Informe de Estadísticas del Sector Lácteo, (2020) en el país, se produjeron 12,553,809 litros de leche fluida donde se importaron 2,154,000 millones de dólares de productos lácteos, y se exporto 626 millones de dólares (CANILEC, 2020), generando que el país no alcance su autosuficiencia en producción de leche, razón por la cual actualmente el país ocupa el primer lugar como importador de leche en polvo a nivel mundial (Loera y Banda, 2017).

Por otro lado, como ha sido mencionado en capítulos anteriores en el presente estudio. El EC causa cambios fisiológicos en las hembras bovinas lo que genera una menor producción de leche, así como una baja calidad en la misma, sobre todo durante épocas de verano, siendo esta reducción en producción de hasta un 50% en comparación con el invierno (Anzures *et al.*, 2015).

Actualmente en México se desconocen las pérdidas económicas en producción de leche por efectos del EC, sin embargo, se puede teorizar que estas pérdidas son importantes. En Estados Unidos las pérdidas económicas en producción de leche por EC se han registrado hasta en 2.36 millones de dólares anualmente, datos que representan la relevancia económica de dicha problemática (Wang *et al.*, 2020).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Manejo de los animales

Para el mantenimiento y manejo de los animales empleados en el presente estudio, se implementó la guía del uso ético, y bienestar animal en la investigación (FASS, 2010), nacional (NAM, 2002). (Falta la institucional)

4.2 Área de estudio y condiciones climáticas

El estudio se realizó en establos lecheros comerciales en dos estados del país; el estado de Chihuahua se localiza entre las coordenadas 28° 38' N y 103° 18' W, con una altitud de 1,424 msnm. El cual presenta un clima semiárido, una precipitación media anual de 260.8 mm, una temperatura máxima promedio de 36° C entre los meses de mayo a agosto y mínima promedio de -4°C entre los meses de noviembre a enero. La Comarca Lagunera que se encuentra entre las coordenadas 25° 31 'N y 103° 13' W, con una altitud de 1,110 msnm, presenta un clima semiárido, una precipitación media anual de 225 mm con una temperatura máxima promedio de 40°C durante mayo a agosto y mínima de 4 °C durante diciembre y enero (CONAGUA, 2020; INIFAP, 2020).

4.3 Manejo de los animales y colección embrionaria

En el presente estudio se utilizaron un total de 825 vacas Holstein, de las cuales 336 pertenecen al estado de Chihuahua donde el 70 % fueron novillas nulíparas y 30 % vacas lactantes con dos o tres partos mientras que en la Comarca Lagunera se emplearon 489 donde el 77 % eran novillas nulíparas y 23 % vacas lactantes de dos a tres partos. Todas las vacas y vaquillas presentaron una condición corporal de 2.5 a 3.75, fueron seleccionadas como receptoras y sometidas a un programa de transferencia embrionaria, con embriones procedentes de la técnica OPU, los cuales de manera homogénea se encontraban en su grado de blastocito expandido (Bx), de calidad uno (excelente o buena), de acuerdo con las normas de clasificación de la

Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS) (Robertson y Nelson, 2010), durante todos los meses del año de 2020.

Se seleccionaron las vacas receptoras con rango de 60 a 90 días de lactancia y con una producción láctea mayor a 10,000 kg. La alimentación se realizó en conformidad con lo descrito por el NRC (2001) de acuerdo con su estado fisiológico y en el caso de vacas lactantes, de acuerdo con su producción láctea.

4.4 Procedimiento de la OPU

El procedimiento de la OPU descrita a continuación se realizó en base a la publicación de Solís *et al.*, (2012).

Para la visualización de los folículos ováricos se implementó un equipo de ultrasonido equipado con un transductor vaginal, una guía de aspiración folicular y una cánula de (20 G × 2") conectado a una bomba al vacío, donde se colocaron tubos de centrifugado de 50 ml previamente preparados con 400µl de heparina y 5ml de PBS, en dichos tubos se alojaron los ovocitos que fueron aspirados.

4.5 Procedimiento de la selección de ovocitos

Los procesos de selección y clasificación de ovocitos se realizaron de acuerdo con las obras descritas por Shioya *et al.*, (1988) y Stringfellow y Siedel (1998), Después de la aspiración los ovocitos colectados, se filtraron por medio de un filtro plástico para eliminar los restos de sangre, hasta que se obtuvo una muestra transparente. Se seleccionaron los ovocitos de acuerdo contenido celular, cantidad de capas de células del cúmulo y pigmentaciones dentro del núcleo, empleando un estereoscopio, finalmente se seleccionaron aquellos pertenecientes a los grados I, II y III.

4.6 Procedimiento para la maduración de ovocitos

Después de ser seleccionados los ovocitos, para completar su maduración nuclear se sometieron a un proceso de maduración MIV de acuerdo con el protocolo de Paula-Lopes y Hansen, (2002).

Los ovocitos se incubaron colocándolos en grupos de 20 ovocitos a 38°C, durante 24 horas en un ambiente controlado de 5% de CO² y 100% de humedad relativa, en 50 µl medio de maduración (suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 ui de penicilina ml⁻¹, 0.01 mg de estreptomicina ml⁻¹, 2 µg de estradiol ml⁻¹, 20 µg de FSH ml⁻¹ y 0.2 mmol de piruvato sódico ml⁻¹).

4.7 Procedimiento para la fertilización de ovocitos

El proceso descrito a continuación se rige por la publicación Paula-Lopes y Hansen, (2002).

Después del proceso de maduración, los ovocitos se lavaron con medio de lavaje y se transfirieron a placas de fertilización cubiertas con aceite mineral, se colocaron 4 gotas de semen sexado y en cada una de ellas 25 a 30 ovocitos en un medio de fecundación que contenía 600 µL de medio de fertilización y 25 µL de PHE (penicilina 0,5 mM, hipotaurina 0,25 mM y epinefrina 25 µM en NaCl al 0,9% [p / v]) y se fertilizaron con 1x10⁶ espermatozoides/ml en las mismas condiciones controladas de atmosfera que la maduración *in vitro* durante 18 horas.

4.8 Procedimiento del cultivo de embriones

El proceso descrito se realiza con base en la técnica empleada por Paula-Lopes y Hansen, (2002), con la única variación del uso del medio de cultivo por cuestiones de disposición.

Posterior a las 18 horas de fertilización los presuntos cigotos se sometieron a un procedimiento de cultivo de embriones CIV; se centrifugaron durante cinco minutos en un medio comercial y posteriormente se lavaron tres veces en con el mismo medio, seguido de esto se depositaron en grupos de 25 embriones

en un medio de cultivo de 50 μ L de medio de cultivo (cubriéndose con aceite mineral) y se incubaron a 38°C con 5% CO² durante siete días.

4.9 Criopreservación embrionaria.

El procedimiento de congelamiento de embriones se llevó a cabo colocando los embriones en placas con una solución de congelación (añadiéndole 1.5 ml de etilenglicol) a una temperatura de 22°C durante 25 minutos. A continuación, los embriones se cargaron de manera individual en pajuelas de 0.25 ml y se almacenaron a -32°C congelándose gradualmente comenzando con -6°C durante 10 minutos, después la temperatura se comenzó a disminuir de manera controlada disminuyendo 0.5°C por minuto hasta llegar a los -32°C, finalmente estos se almacenan en nitrógeno líquido a -196°C (Zárate *et al.*, 2018).

4.10 Sincronización

Para sincronizar a las receptoras se empleó un dispositivo intravaginal el cual libera progesterona de manera controlada. El día cero se aplicó dos ml de benzoato de estradiol, mientras que el día cinco se administró 1.5 ml de gonadotropina coriónica equina. El dispositivo intravaginal se retiró el día siete y se aplicó un ml de cipionato de estradiol (SincroCP®, Ourofino, México) (Zárate *et al.*, 2018).

4.11 Transferencia y diagnóstico de gestación.

El embrión seleccionado se transfirió el día siete, en su grado embrionario Bx, calidad uno (Robertson y Nelson, 2010), de igual manera la hembra receptora se encontraba en su día siete de sincronización, se descongeló la pajuela del embrión en agua templada a 38°C por 40 segundos, la pajuela se cargó en la pistola de transferencia (TED®, INO-025, Brasil) y se colocó en la curva del cuerno uterino del lado donde se encontró la presencia del cuerpo lúteo, con una medida de 12-18 mm, el cual fue reconocido implementando ultrasonido el diagnóstico de gestación se realizó a los 60 días, utilizando el mismo equipo de ultrasonido para reconocer las estructuras (Naranjo *et al.*, 2016).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que las tasas de gestación de vacas receptoras Holstein a las cuales se les transfirió un embrión criopreservado estadio blastocito expandido presento diferencias significativas en las dos regiones analizadas; la Comarca Lagunera con () y el estado de Chihuahua con ().

Ambas regiones presentan condiciones ambientales diferentes de tal manera que se considera que estas influyeron de manera directa en los diferentes resultados obtenidos, para los dos grupos de hembras bovinas situados en regiones diferentes. A continuación, se discuten varios factores externos ambientales, que pudieron afectar la capacidad de implantación de los embriones transferidos a las receptoras.

Actualmente se tiene conocimiento sobre el rendimiento reproductivo de las hembras bovinas *Bos Taurus*, raza Holstein, en México, se ha registrado que durante la época de verano se presenta una disminución en la fertilidad en comparación con el invierno (Alnimer *et al.*, 2002; Lozano *et al.*, 2005).

Al respecto estudios han reportado que las altas temperaturas y la humedad relativa, tienen efectos directos sobre la fisiología reproductiva de esta raza (Arias *et al.*, 2008), afectan el celo, desarrollo folicular, el desarrollo embrionario y la implantación (Castaño *et al.*, 2014; Góngora y Hernández, 2010; Marin y Velasquez, 2010).

Por otro lado, se ha descrito que el EC afecta el equilibrio adecuado del sistema endocrino provocando la liberación de grandes cantidades de cortisol (González *et al.*, 2020). Algunos aportes científicos más han reportado que al presentarse una temperatura promedio de 29.5 °C y una humedad relativa del 9.6 % se incrementan las cantidades de cortisol presentes en la sangre de la raza Holstein (Faure *et al.*, 2004).

Cuadro 1. Promedio de temperatura, humedad relativa e ITH en el año 2020 en el estado de Coahuila y Durango.

Mes	Coahuila			Chihuahua		
	Temperatura (° C)	Humedad (%)	ITH	Temperatura (° C)	Humedad (%)	ITH
Enero	21.6	37%	64	20.0	45%	63
Febrero	23.5	27%	65	20.9	37%	65
Marzo	29.2	22%	70	25.4	29%	69
Abril	31.5	19%	72	28.9	24%	71
Mayo	34.1	23%	74	33.4	23%	72
Junio	34.8	33%	74	35.3	33%	73
Julio	35.7	41%	75	33.6	58%	71
Agosto	35.5	40%	75	35.1	64%	71
Septiembre	30.4	48%	71	30.4	61%	68
Octubre	31.2	41%	71	30.7	52%	69
Noviembre	27.2	39%	68	26.7	47%	68
Diciembre	22	37%	64	19.5	45%	64

Se muestran los promedios mensuales

El cortisol genera una cadena de procesos donde se secreta la hormona liberadora de corticotropina por sus siglas en inglés (CRH), a través del hipotálamo (Castaño *et al.*, 2014). La liberación de (CRH), en el organismo de la hembra disminuye la función reproductiva, ya que se reduce la secreción del grupo de hormonas GnRH en el hipotálamo y la adenohipófisis, lo que finalmente genera una baja síntesis de estradiol, ocasionando una respuesta negativa en la expresión del estro y las tasas de gestación (Castaño *et al.*, 2014; González *et al.*, 2020).

Por otro lado, se ha analizado que, en vacas con altos niveles de cortisol presentes en el plasma, no presentan el pico preovulatorio de LH, y por lo tanto se ve inhibida la presencia del CL, estos comportamientos se han asociado también al estrés producido por un manejo inadecuado. No obstante, en el presente estudio el estrés por un mal manejo no pudo haber influido debido a que se comprobó la presencia de un CL con una medida de 12-18 mm, mediante ultrasonido, antes de la transferencia del embrión (González *et al.*, 2020).

Otro factor importante producido por el EC que pudo influir en los resultados obtenidos fue, que debido a esta condición se inhibe la presencia de la hormona progesterona (P4) (Larrosa, 2021), hormona necesaria para que la

gestación pueda mantenerse, en el organismo bovino, se ha comprobado que ante bajos niveles de progesterona $P4 \leq 1$ ng/mL provocan una baja fertilidad (Marín y Velásquez, 2010).

A su vez se ha descrito que la baja concentración de la hormona (P4) disminuye la probabilidad del cigoto a sobrevivir, ya que cambia las condiciones adecuadas del útero, incrementando los índices de mortalidad (Larrosa, 2021). Otros factores ambientales, que comprometen la capacidad de implantación de un embrión que pudieron influir en el presente estudio son descritos a continuación; Se ha comprobado que en vacas Holstein que presentan altas temperaturas rectales y una mayor frecuencia respiratoria se ven disminuidas tasas de concepción (Correa *et al.*, 2009).

Las altas temperaturas rectales registradas durante el verano en el norte de México son de hasta 10°C superiores a las registradas durante invierno, donde se observan bajas tasas de fertilidad (Anzures *et al.*, 2015). Además, la temperatura corporal normal debe de ser de 38,5°C, no obstante, durante el verano se registra que su temperatura corporal aumenta hasta 40°C, condición que desencadena un EC severo (Anzures *et al.*, 2015).

Para tratar de incrementar las tasas de gestación de hembras receptoras, se han desarrollado programas de sincronización para facilitar la detección del estro durante el verano ya el EC provoca que no se pueda detectar, sin embargo, no se han obtenido resultados positivos ya que se ha observado una muerte embrionaria temprana (Correa *et al.*, 2009).

De acuerdo con el presente estudio, se considera que los resultados obtenidos reflejan una relación directa entre las tasas de gestación obtenidas en los dos grupos de receptoras bovinas empleados, en condiciones ambientales diferentes, los datos ambientales de la Comarca Lagunera y de Chihuahua se consultaron mediante plataformas públicas (CONAGUA, 2020; INIFAP, 2020).

Se ha descrito que factores ambientales como las altas temperaturas, elevada humedad relativa, escaso movimiento del aire y una alta radiación solar provocan EC en las hembras bovinas (Polsky y Keyserlingk, 2017). Por lo

anterior los registros de estos factores son determinantes para comprender su relación con las tasas de gestación de la raza Holstein. (Arias *et al.*, 2008).

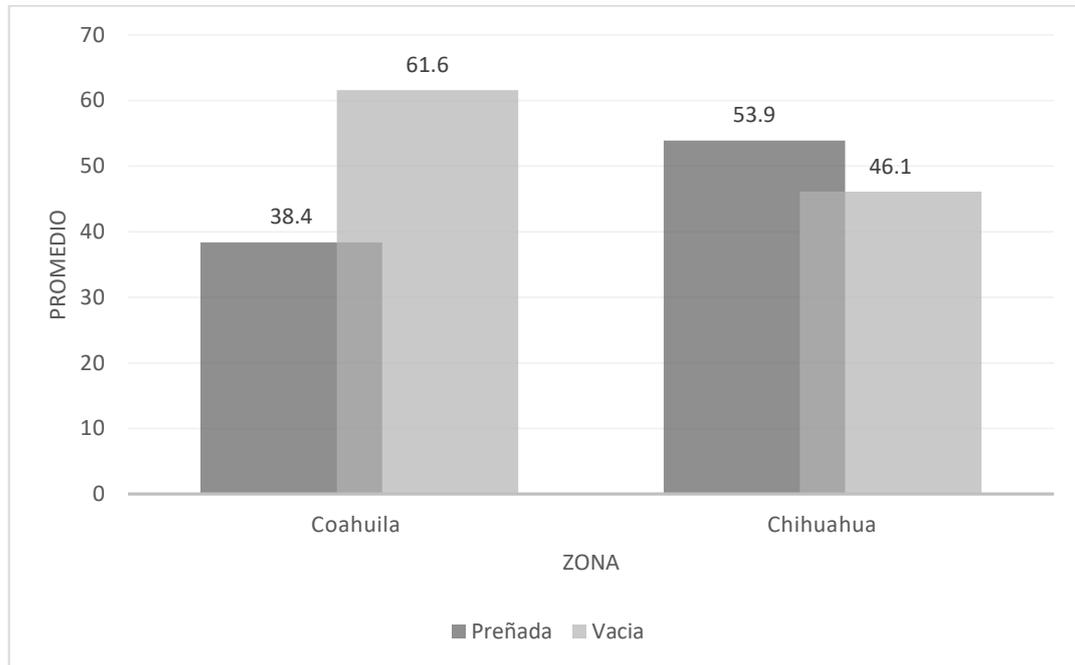


Figura 6.- Promedio de gestación en las dos zonas del estudio. Se muestran promedios, Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa $p=0.01$

Sin embargo, los registros disponibles no son suficientes para presentar resultados más determinantes, debido a que solo se tienen disponibles las medias o promedios de temperatura y humedad relativa por meses de tal manera que no se pueden presentar resultados más específicos.

Se recomienda que para incrementar el conocimiento sobre el rendimiento reproductivo de receptoras que reciben un embrión mediante la técnica (OPU), se considere realizar un registro diario de la temperatura y humedad relativa que rodean a las receptoras, para obtener resultados más precisos de tal manera que se puedan desarrollar procedimientos más adecuados para aumentar las tasas de gestación implementando esta técnica de biotecnología reproductiva.

VII. CONCLUSIÓN

Los factores ambientales tienen una relación directa sobre la eficiencia de las biotecnologías reproductivas. Las receptoras de raza Holstein que reciben embriones provenientes de la técnica OPU son afectadas en su eficiencia reproductiva por las elevadas temperaturas presentes en dos de las cuencas lecheras más importantes del país; La Comarca Lagunera y Chihuahua.

VIII. REFERENCIAS

- Academy of Medicine, Mexico and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, México, DF, México.
- Aldrete, A., Pineda, B., Barrios, P., Flores, A. (2014). Respuesta al estrés por calor en la vaca lechera criolla Holstein en la región ciénega del estado de Jalisco, México. *Abanico Veterinario* 4 (3), 31-42.
- Alnimer, M., De Rosa, G., Grasso, F., Napolitano, F., Fronteras, A. (2002). Efecto del clima en la respuesta de tres celos técnicas de sincronización en la lactancia. *Ciencias de la reproducción animal* 71, 157-168.
- Paula-Lopes, F.F., y Hansen, P.J. (2002). Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biology of reproduction* 66, 1169-1177.
- Alvarado, A., Gamarra, G., Gallegos, A., Samillán, V. (2016). Tasa de recuperación de ovocitos en vacas Holstein en descarte. *Anales Científicos* 77 (1), 63-68.
- Anzures, F., Macias, U., Álvarez, F., Correa, C., Diaz, Molina., Hernández, R., Avendaño, I. (2015). Efecto de época del año (verano vs. Invierno) en variables fisiológicas, producción de leche y capacidad antioxidante de vacas Holstein en una zona árida del noreste de México. *Archivos de medicina veterinaria* 47 (1).
- Arias, R., Mader, T., Escobar, P. (2008). Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche. *Archivo Médico Veterinario* (40), 7-22.
- Ariza, L., Camacho, W., Serrano, C. (2006). Evaluación retrospectiva de la tasa de preñez obtenida por transferencia de embriones en diferentes cruces bovinos en el municipio de Puerto Araujo. *Revista Electrónica Veterinaria*, 7 (4), 1-7.
- Ayala, L., Pesantez, J., Ramiro, E., Silvana, M., Elías, M., Santiago, C., Vázquez, J., Pesantez, E. (2017). Tamaño del folículo ovulatorio, cuerpo lúteo y progesterona sanguínea en vaquillas receptoras de embriones de tres razas en pastoreo en Ecuador. *Reproducción Animal* 29 (2), 65-72.
- Báez, F., Chávez, A., Hernández, H., Villamediana, P. (2010). Evaluación de la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos de vacas con predominancia fenotípica Bos Taurus y Bos Indicus. *Revista Científica* 20, (3).
- Báez, G y Grajales, H. (2009). Anestro posparto en ganado bovino en el trópico. *Revista MVZ Córdoba*, 14 (3).
- Ballent, M., Graciela, H., Bilbao, G., Dick, A. (2003). Pubertad, peso vivo y desarrollo corporal en diferentes biotipos bovinos productores de leche: una actualización bibliográfica. *ITEA* 99 (2), 130-138.
- Biggs, A. (2012). *Biología*. Ed. McGraw Hill
- Bó, G, A., Baruselli, R, J., Mapletoft, R, J. (2013). Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Animal Rreproduction* 10 (3), 142-142.

- Bonilla, L., Bonilla, D., Gómez, R. (2019). Producción de embriones bovinos del laboratorio *in vitro* Colombia durante el año 2019. *Working Papers ECAPMA*, 1, 6-16.
- Cabrera, P y Fernández, A. (2006). Criopreservación de embriones: una herramienta básica en la reproducción asistida. *Reproducción Animal* 47 (2), 59-69.
- Callejas, S. (2001). *Fisiología del ciclo estral bovino*. Ed. UNILZ y SYNTEX
- Callejas, S. (2004). Control Farmacológico del ciclo estral bovino: bases fisiológicas, protocolos y resultados. *Taurus* 6 (24), 22-34.
- Cámara Nacional de Industriales de la Leche. (2020). Informe de Estadísticas del Sector Lácteo 2020. <https://www.canilec.org.mx/estadisticas-2/>
- Castaño, F., Rugeles, C., Betancur, C., Ramírez, C. (2014). Impacto del estrés calórico sobre la actividad reproductiva en bovinos y consideraciones para mitigar sus efectos sobre la reproducción. *Revista Biosalud* 13 (2), 84-94.
- Cavalloti, B., Ramírez, V., Cesín, J., Cervantes, F., Carrera, B., Ayala, A., Rodríguez, G., Guerrero, J., Alatorre, A., Bobadilla, E., Flores, J., Perea, M., Sosa, M., Thome, H., Pérez, G., Sánchez, E., Morales, A., Martínez, F., Álvarez, A... Santos, V. (2019). *La ganadería ante escenarios complejos*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) (2020). Reporte del clima en México. <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/diagnostico-climatico/reporte-del-clima-en-mexico>
- Cordova, A., Guerra, J., Villa, A., Olivares, J., Cansino, G., Juárez, M., Félix, J. (2015). Congelación de embriones bovinos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 9 (2), 22-40.
- Corrales, S., Guerra, R., Sandoya, G., Armas, R. (2012). Efecto de sincronización de la onda folicular y de la frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman. *Revista electrónica de veterinaria* (13) 10, 1-16.
- Correa, C., Santos, G., Aventaño, L., Rivera, F., Álvarez, D., Ardon, F., Diaz, R., Collier, R. (2009). Enfriamiento artificial y tasa de concepción de vaquillas Holstein con estrés térmico. *Archivos de Zootecnia* (58) 22, 231-239.
- Corredor, E., Páez, E. (2012). Aplicaciones de la ultrasonografía en la reproducción bovina. *Ciencia y Agricultura* 9 (2), 29-37.
- Cunningham, J y Klein, B. (2014). *Fisiología Veterinaria*. Ed. ELSEVIER.
- De Rensis, F., López, F., García, I., Morini, G., Scaramuzzi, R. (2017). Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season. *Theriogenology* 91, 145-153.
- Della, M. (2016). El examen clínico-reproductivo en hembras bovinas en la región semiárida central [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de la Pampa, Argentina] <https://repo.unlpam.edu.ar/handle/unlpam/969>
- Dikmen, S y Hansen, J. (2009). Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment. *Journal of dairy science* 92, 109-116.

- Duica, A., Tovío, N., Grajales, H. (2007). Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de trasplante de embriones bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria* (14), 107-124.
- Espinoza, J., Carrillo, A., Orona, I., Molina, V., Torres, D., Fabela, A. (2018). Technical and Socioeconomic Characteristics of Stables of the Intensive Production System of Cow Milk of the Comarca Lagunera. *AGROFAZ*, 18 (1), 101-109.
- FASS. (2010). Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and teaching, 3rd Edition, Federation Animal Science Society, Champaign, IL, USA. 177.
- Faure, R., Fernández, L., Morales, D. (2004). Concentraciones de cortisol sérico en novillas Holstein durante las dos épocas del año en Cuba. *Revista electrónica de veterinaria* 12 (12).
- Ferreira, R, M., Ayres, H., Chiaratti, M, R., Ferraz, M, L., Araújo, A, B., Rodríguez, C, A., Watanabe, Y, F., Vireque, A, A., Joaquim, D, C., Smith, L, C., Meirelles, F, V., Basurelli, P, S. (2011). The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *American Dairy Science Association*, 94, 2383-2392.
- Findlay, J., Kerr, J., Britt, K., Liew, S., Simpson, E., Rosairo, D., Drummond, A. (2009). Ovarian Physiology; Follicle Development, Oocyte and Hormone Relationships. *Animal reproductions* 6 (1), 16-19.
- Garcia, S., Morotti, F., Bim, F., Alvares, P., Oliveira, A., Bertan, C., Castilho, C., Zaneti, R., Folino, J., Fonceca, A., Marcondes, M. (2020). Synchronization of stage of follicle development before OPU improves embryo production in cows with large antral follicle counts. *Animal reproduction science*. (221) 1-2.
- Gonella, A., Atuesta, J., Bernal, S., Chacón, L. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos *in vitro*. *Revista de investigación agraria y ambiental* (4), 1 65-80.
- Góngora, A y Hernández, A. (2010). La reproducción de la vaca se afecta por las altas temperaturas ambientales. *Revista Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Actualidad y Divulgación Científica*, 13 (2), 141-151.
- González, S., Cabodevila, J., Callejas, S. (2020). Dinamiza folicular y su relación cortisol-respuesta ovulatoria en vacas tratadas con diferentes cantidades de progesterona. *Revista Veterinaria* (31) 2, 109-114.
- Solís, C., Guerra, R., Sandoya, G., De Armas, R. (2012). Efecto de sincronización de la onda folicular y de la frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman. *Revista electrónica de Veterinaria* 13.
- Guaqueta, H. (2009). Ciclo estral: Fisiología básica y estrategias para mejorar la detección de celos. *Revista de la Facultad de Medicina y de Zootecnia* 56 (3), 163-183.
- Hafez, E. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Ed. McGrawHill

- Hernández, J. (2016). *Fisiología de la Reproducción de Bovinos Lecheros*. Ed. FMVZ-UNAM
- Hernández, V., Aureliano, G., Jiménez, A., Rodríguez, M., Prieto, J., Chacón, J., Hernández, V., Aureliano, G., Jiménez, A., Rodríguez, M., Prieto, J., Chacón, J., Escobar, F. (2008). *Reproducción en la Vaca Fisiología y Aplicaciones*. Ed. UNAL
- Herradón, P. G., Quintela, L. A., Becerra, J. J., Ruibal, S., y Fernández, M. (2007). Fecundación *in vitro*: alternativa para la mejora genética en bovinos. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 15 (1), 34-41.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). (2020). Red Nacional de Estaciones Agrometeorológicas Automatizadas. <https://clima.inifap.gob.mx/lnmysr/Estaciones>
- Kimura, K y Matsuyama, S. (2014). Successful nonsurgical transfer of bovine elongating conceptuses and its application to sexing. *Journal of Reproduction and Development*. 60 (3), 210-215.
- Landínez, J., Villamediana, P., Hernández, H., Soto, E. (2010). Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. Nota técnica. *Revista Científica* 20 (6), 659-664.
- Larocca, C. y Filipiak, Y. (2017). In Vitro embryo production with frozen thawed bovine semen sexed. *International Journal of Morphology* 35 (1), 371-375.
- Larrosa, F. (2021). Impacto del estrés térmico sobre el índice de preñez en vaquillas lecheras. *Ganadería* 16 (1), 17-34.
- Li, J., Narayanan, V., Kebreab, E., Dikmen, S., Fadel, J. (2021). A mechanistic thermal balance model for dairy cattle. *Biosystems engineering* 209, 256-270.
- Loera, J. y Banda, J. (2017). Industria lechera en México: parámetros de la producción de leche y abasto del mercado interno. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 19 (4), 419-426.
- López, G., Brizuela, A. B., Rondán, G., Lissaso, C.M., Alejandra C. Kemerer, A.C., de los Santos, M. (2016). Determinación del índice de temperatura y humedad (ITH) para vacas lecheras, en el departamento Nogoyá, entre ríos. *Revista Científica Agropecuaria*. 20, 57-65.
- Lozano, R., Vásquez, C., González, E. (2005). Efecto del estrés calórico y su interacción con otras variables de manejo y productivas sobre la tasa de gestación de vacas lecheras en Aguascalientes, México. *Veterinaria México* 36 (3), 245-260.
- Marin, V y Velasquez, U. (2010) ¿Cómo afecta el estrés calórico la reproducción? *Biosalud* 9, 83-95.
- Marquant-Le, B., Guienne, B., Gerard, A., Thibault, C. (1989). *In vitro* culture of bovine eggs fertilized either *in vivo* or *in vitro*. *Reproduction Nutrition Development* (29), 559-568.
- Mcmeekan, C. (1991). *De pasto a leche*. Ed. Agropecuaria hemisferio sur
- NAM (2002). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National
- Naranjo, F., Becerril, C., Canseco, R., Zárate, O., Soto, A., Rosales, F., Rosendo, A. (2016). Comparison of two embryo transfer methods in the tropical

- milking criollo cattle. *Ecosistemas y recursos agropecuarios* (3): 7 pp 113-120.
- National Research Council (NRC). (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. Seventh Revised Edition, 2001. Washington, DC: The National Academies Press.
<https://profsite.um.ac.ir/~kalidari/software/NRC/HELP/NRC%202001.pdf>
- Navok, D., Andonov, S., Trajchev, M. (2016). Antioxidant status in dairy cows during transition period. *Journal of Agricultural Food and Environmental Sciences* 68, 1-8.
- Organización Meteorológica Mundial (OMM). (2011). El décimo año más cálido en el mundo, el más cálido en un periodo la Niña, y el de menor volumen de hielo marino en el mar ártico. www.wmo.int/pages/index_es.html
- Ortega, J., Favela, J., Hernández, J., Pawoli, C. (2011). Efecto de la aplicación de un implante de progesterona en vacas repetidoras Holstein-Friesian en La Comarca Lagunera, México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 10 (1) 73-78.
- Oyuela, L., Jiménez, C. (2010). Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. *Revista Medico Veterinaria Zootécnica* 57 191-200.
- Peña, A., Velasquez, J., Velasquez, G., Flóres, H., Cardozo, J. (2001). *El papel de las donadoras, de las receptoras y de los detectores de celo (machos y hembras) en la superovulación y transferencia de embriones*. Ed Therios.
- Polsky, L y Keyserlingk (2017). Efectos del estrés por calor en el bienestar del ganado lechero. *Revista de ciencia láctea* 100 (11) 1-13.
- Price, O y Orihuela, A. (2010). *Conducta animal aplicada al cuidado y producción pecuario*. Ed Trillas
- Quispe, C., Fernández, E., Ancco, E., Oriundo, K., Mellisho, E. (2015). Efecto de la raza de la donadora sobre la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal. *SPERMOVA* 5 (1), 59-62.
- Quisque, C., Ancco, E., Solano, J., Unchupaico, I., Mellisho, E. (2018). Embryonic development capacity of bovine oocytes aspired by ovum pick-up and from slaughterhouse ovaries. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29 (4), 1114-1121.
- Ríos, V., Ortiz, N., Valencia, A., Orjuela, J. (2013). Estrés calorico y su relación con variables reproductivas en machos bovinos en la Amazonia Colombia. *Revista Electrónica de Veterinaria* 14 (4), 1-12.
- Robertson I., y Nelson R. E. (2010) Certification and identification of the embryo. In *Manual of International Embryo Transfer*. Quarter edition. (Eds D.A Stringfellow and M.D. Givens.) pp 86-105. Champaign USA.
- Rosete, J., Álvarez, H., Urbán, D., Fragoso, A., Asprón, M., Rios, A., Pérez, S., De La Torre, J. (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino; cinco décadas de investigación en México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* 12 (3).
- Ruiz, S. (2010). Ovum Pick Up (OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la reproducción. *Frisona española*, 31, 58-64.

- Ryan, D., Galvin, J., Farrell, K. (1999). Comparison of oestrous synchronization regimens for lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* (56), 153-168.
- Salgado, E y Lopera, R. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización *in vitro* en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 31 (3).
- Sánchez, I., Ojeda, W., Villanueva, J., Diaz, J., Velásquez, M., Muñoz, J. (2007). Clima y disponibilidad de agua: análisis del pasado para prever el futuro. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas*. 6, 169-176.
- Sartori, R., Rosa, G., Wiltbank, M. (2002). Ovarian Structures and Circulating Steroids in Heifer and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. *Journal of Dairy Science*, 85, 2813-2822.
- Secretaria del medio ambiente y recursos naturales (SEMARNAT). (2020). Informe de la situación del medio ambiente en México. <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe18/index.html>
- Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. (1988) In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology* (30) 489-496.
- Soto, Y., Casas, E., Betancourt, J., Fernández, F. (2019). Desarrollo embrionario de bovino in vitro cocultivado con células oviductales del *cumulus oophorus*. *Revista de Salud Animal* 42 (1).
- Stringfellow, D. A. y Siedel, S. M. (1998) *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. Third Edition, Savoy Illions: International Embryo Transfer Society. USA.
- Van Wagtenndonk, A, M. (2006). Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations. *Theriogenology*, 65 (5), 914-925.
- Vasconcelos, J., Sartori, R., Oliveira, H., Guenther, J., Wiltbank, M. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56 (2), 307-314.
- Vélez, M. y Iribe, L. (2010). ¿Cómo afecta el estrés calórico la reproducción? *Biosalud* (9) 2, 83-95.
- Viera, L, M., Rodríguez, C, A., Castro, A., Guerreiro, B, M., Silveria, C. R., Moreira, R, J., Sá Fiho, M, S., Bó. G, A., Mapletoft, R, J., Baruselli, P, S. (2014). Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 82 (2), 318-324.
- Wang J., Li J. Wang F., Xiao J., Wang Y., Yang H., Li S., y Cao Z. (2020). Heat stress on calves and heifers: a review. *J Animal Sci Biotechnol*. 11, 79.
- Zárate, O., Cisneros, P., Canseco, R., Montiel, F., Carrasco, A. (2018). Transferencia de embriones bovinos criopreservados: Efecto de la blastocentesis. *Agrociencia* (52) 21-32.