

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VIVO* E *IN VITRO* EN VACAS
PRODUCTORAS DE CARNE Y DE LECHE

Tesis

Que presenta MARCO ANTONIO GONZÁLEZ RAMOS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

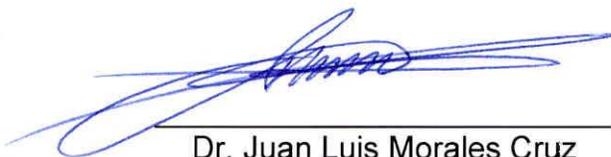
Torreón, Coahuila

Marzo 2023

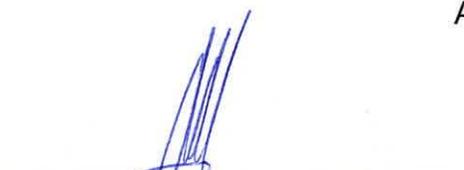
PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VIVO* E *IN VITRO* EN VACAS
PRODUCTORAS DE CARNE Y DE LECHE

Tesis

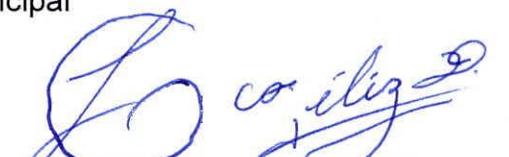
Elaborada por MARCO ANTONIO GONZÁLEZ RAMOS como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Producción Agropecuaria con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría.



Dr. Juan Luis Morales Cruz
Asesor principal



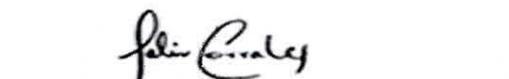
Dr. Oscar Ángel García
Asesor



Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras
Asesor



Dra. Leticia Romana Gaytán Alemán
Asesor



Dr. Alex Solís Corrales
Asesor



Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Jefa del Departamento de Postgrado



Dr. Antonio Flores Naveda
Subdirector de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a **Dios** por haber permitido llegar hasta aquí hoy, por darme fuerza y salud para llevar a cabo mis metas y objetivos. Quiero darle las gracias por su amor infinito

A mi querida **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**- Unidad Laguna por brindarme una vez más un espacio en lo profesional y poder alcanzar y concluir un sueño más en lo profesional.

Agradezco a mi asesor principal al **Dr. Juan Luis Morales Cruz** por su tiempo y dedicación para la culminación de este gran proyecto.

Al **Dr. Oscar Ángel García** y a la **Dra. María Guadalupe Calderón Leyva** por todo el apoyo brindado para concluir este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado.

A mis padres, **José Felix González Martínez** y a **Josefa Ramos García** por creer siempre en mí y apoyarme incondicionalmente en el trascurso de este camino muchas gracias los quiero mucho.

Agradezco a **Aurelia Nájera Cruz** por su amistad, apoyo moral incondicional y por su valioso trabajo administrativo que recibí durante toda mi formación.

DEDICATORIA

A mis hijos **Andrea Monserrat González López** y **Juan José González López** con todo mi esfuerzo cariño y amor quienes fueron, son y serán siempre el motor que me impulsan a tomar nuevos horizontes.

A mi madre **Josefa Ramos García** con mucho cariño por que siempre creyó, luchó y jamás dudo de mi capacidad para lograr mis objetivos y metas trazadas en mi vida profesional.

A mis hermanos **Neli González Ramos** y **Miguel Ángel González Ramos** que a pesar de la distancia siempre recibí palabras de apoyo para culminar este proyecto, los amo con todo el corazón.

A **Brenda Isela Ojeda Juárez** por todo el gran apoyo brindado, no fue sencillo culminar con éxito este proyecto, sin embargo, siempre fuiste muy motivadora y esperanzadora diciéndome que lo lograría perfectamente. Infinitas gracias por acompañarme a recorrer este largo camino llamado ciencia me ayudaste hasta donde te fue posible, incluso más que eso.

CARTA DE ACEPTACIÓN DE ARTICULO

[IJAnS] Acceptance Letter

2023-01-20 10:42 AM

Dear Drs Marco Antonio Gonzalez-Ramos, Oscar Ángel García , Francisco Gerardo Veliz Deras , Leticia Romana Gaytán Alemán, Juan Manuel Guillen Muños , Alex Solís Corrales , Hugo Zuriel Guerrero Gallegos, Juan Luis Morales Cruz:

The article "**The Ovulatory response of Beef and Dairy cows subjected to two follicular emergence synchronization protocols before superovulation**" has been accepted for publication in The Indian Journal of Animal Sciences.

This article will be published after undergoing copyediting and proofreading stage for which we will send you copyediting review request and proofreading request.

Editor

Indian Journal of Animal Sciences

Email: editor.ijans@icar.gov.in

Phone: 011-25841960 Ext 617

[The Indian Journal of Animal Sciences](#)

CARTA DE ENVIÓ DE ARTICULO



RCHSZA 5:15 p. m.
para mí ▾



Dear Doctor en Ciencias Morales Cruz,

The PDF for your submission, "Efecto de la mastitis clínica sobre la competencia ovocitaria en la producción de embriones in vitro obtenidos de vacas Holstein." is ready for viewing.

This is an automatic email sent when your PDF is built. You may have already viewed and approved your PDF while on-line, in which case you do not need to return to view and approve the submission

Please go to <https://www.editorialmanager.com/rchsza/> to approve your submission.

Username: JMoraless Cruz-757

Password: <https://www.editorialmanager.com/rchsza/l.asp?i=13765&l=IMI76BCI>

[Mostrar texto citado](#)

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA	iii
CARTA DE ACEPTACIÓN DE ARTICULO	iv
CARTA DE ENVIÓ DE ARTICULO.....	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRAC.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
II.REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Regulación neuroendocrina del ciclo estral	4
2.1.2 Fases del ciclo estral.....	4
2.1.3 Dinámica folicular	5
2.2 Anatomía del aparato reproductor de la hembra	6
2.3 Protocolos de sincronización del ciclo estral	6
2.3.1 Tratamiento convencional previo a la superovulación.....	7
2.3.2 Tratamiento con combinación de progestágenos y estradiol previo a la superovulación.	7
2.4 Superestimulación ovárica.....	8
2.4.1 Protocolos de superovulación en bovinos	9
2.4.2 Algunos factores que afectan la superovulación	9
2.4.2.1 Estrés calórico.....	10
2.4.2.2 Claudicación.....	10
2.4.2.3 Inflamación.....	11
2.4.2.4 Mastitis.....	11
2.5 Situación actual de la producción de embriones en bovinos	12

2.5.1 Producción de embriones <i>in vivo</i>	12
2.5.2 Producción de embriones <i>in vitro</i>	14
2.6 Ventajas y desventajas de la transferencia de embriones.....	15
2.6.1 Ventajas de la transferencia de embriones	15
2.6.2 Desventajas de la transferencia de embriones.....	15
2.7 Selección y manejo de la vaca donante y receptora de embriones	16
2.7.1 Donadora.....	16
2.7.2. Receptora.....	17
III. LITERATURA CITADA	18
ESTUDIO 1	26
ESTUDIO 2	32
Conclusión Generales	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del aparato reproductor de la hembra bovina (Tomado de UF/IFAS., 2016).....	6
Figura 2. Esquema de proceso de recolección de embriones con la técnica de lavado uterino (tomado de Robertson et al.,2015).....	14

RESUMEN

El objetivo del primer trabajo fue evaluar el efecto de los protocolos de sincronización en la respuesta a tratamientos superovulatorios en ganado de carne y leche, mientras que un segundo estudio fue evaluar el efecto de la mastitis sobre la competencia de los ovocitos y la producción de embriones in vitro en vacas productoras de leche. **En el experimento uno**, se utilizaron 22 vacas productoras de carne y leche divididas en dos grupos: 1) Grupo GCV (n=8; tratamiento convencional) y 2) Grupo DIV+BE (n=14; tratadas con un dispositivo intravaginal que contenía 1,9 g de progesterona +2 mg de benzoato de estradiol, entre los días 10 y 11 de su ciclo estral). Ambos grupos se sometieron a un protocolo de superovulación. Se registró el número de folículos (FL), cuerpos lúteos (CL) y embriones. El número de FL (GCV=13±1.1 vs DIV+BE=7.5±0.9), el número de CL (GCV=12±0.9 vs DIV+BE=10.4±0.7) y embriones recolectados (GCV=11.7±2.1 vs DIV+BE=6.1±1.0) fue mayor en el GCV comparado con el DIV+BE en el ganado de carne, mientras que para la vacas de leche el número de FL (GCV=7.7±1.1 vs DIV+BE=8.0±0.9) y embriones recolectados (GCV=4.7±0.5 vs DIV+BE=4.0±1.4) fue mejor el DIV+BE comparado GCV. En cuanto a la producción de embriones no viables no se encontró diferencias entre tratamiento ni entre razas. **En un segundo experimento** se recolectaron ovocitos de 36 vacas Holstein clasificadas en dos grupos: Grupo I (n=18; vacas sanas, 226 ovocitos) y Grupo II (n=18; vacas con mastitis clínica, 165 ovocitos), del total de ovocitos se obtuvo una tasa de ovocitos maduros del Grupo I de 91 % (205/226) y del Grupo II de 92% (152/165). No existió diferencia significativa, en cuanto a la tasa de clivaje de ovocitos (Grupo I= 44 vs Grupo II=50), tampoco existió diferencia estadística significativa en la tasa de blastocistos (Grupo I=14% vs Grupo II=20%) ni en la viabilidad de blastocistos (Grupo I=14 vs Grupo II=20). Sin embargo, el total de embriones obtenidos por grupo fue menor en el Grupo I (13 vs Grupo II=15), de la misma manera el promedio de embriones por vaca fue menor en el Grupo I (0.72 vs Grupo II= 0.83). Por otro lado, la tasa de embriones viables en el Grupo I fue mayor en comparación con el Grupo II (77 vs 60). Por esta razón en base a los resultados se concluye que el protocolo convencional sin progesterona y BE podría igualar o mejorar la tasa de producción embrionaria

in vivo en vacas independientemente del tipo de producción (carne o leche), y que la inflamación por mastitis no afecta la producción de embriones en ganado Holstein cuando son producidos in vitro, sin embargo, si afecta en la producción de embriones viables.

Palabras clave: biotecnologías, bovinos, superovulación, transferencia de embriones, protocolos, mastitis.

ABSTRAC

The objective of the first work was to evaluate the effect of sound protocols on the response to superovulatory treatments in beef and dairy cattle, while a second study was to evaluate the effect of mastitis on oocyte competence and in vitro embryo production. in dairy cows. In experiment one, 22 cows producing meat and milk were used, divided into two groups: 1) GCV Group (n=8; conventional treatment) and 2) DIV+BE Group (n=14; treated with an intravaginal device that contained 1.9 g progesterone + 2 mg estradiol benzoate, between days 10 and 11 of her estrous cycle). Both groups underwent a superovulation protocol. The number of follicles (FL), corpora lutea (CL) and embryos produced were produced. The number of FL (GCV=13±1.1 vs DIV+BE=7.5±0.9), the number of CL (GCV=12±0.9 vs DIV+BE=10.4±0.7) and collected embryos (GCV=11.7±2.1 vs DIV +BE=6.1±1.0) was higher in GCV compared to DIV+BE in beef cattle, while for dairy cows the number of FL(GCV=7.7±1.1 vs DIV+BE=8.0±0.9) and collected embryos (GCV=4.7 ±0.5vs DIV+BE=4.0±1.4) DIV+BE was better compared to GCV. Regarding the production of non-viable embryos, no differences were found between treatments or between breeds. In a second experiment, oocytes were collected from 36 Holstein cows classified into two groups: Group I (n=18; healthy cows, 226 oocytes) and Group II (n=18; cows with clinical mastitis, 165 oocytes), out of the total number of oocytes, a rate of mature oocytes of Group I of 91% (205/226) and of Group II of 92% (152/165) was obtained. There was no significant difference in terms of oocyte cleavage rate (Group I=44 vs. Group II=50), nor was there a statistically significant difference in the blastocyst rate (Group I=14% vs. Group II=20%). or in the viability of the blastocysts (Group I=14 vs Group II=20). However, the total number of embryos obtained per group was lower in Group I (13 vs Group II=15), likewise the average number of embryos per cow was lower in Group I (0.72 vs Group II= 0.83). On the other hand, the rate of viable embryos in Group I was higher compared to Group II (77 vs 60). Therefore, based on the results, it is concluded that the conventional protocol without progesterone and BE could match or improve the embryonic production rate in vivo in cows regardless of the type of production (meat or milk), and that

inflammation due to mastitis does not It affects embryo production in Holstein cattle when produced in vitro, however it does affect viable embryo production.

Key word: biotechnologies. cattle, superovulation, embryo transfer, protocols, mastitis.

I. INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE), es una de las biotecnologías aplicadas más importante, siendo una de las estrategias que existe en la producción y reproducción bovina, de la misma manera esta biotecnología nos permite incrementar la tasa de los animales elite porque es una técnica que se utiliza para mejorar la capacidad genética del ganado (Hirayama *et al.*, 2019). La TE nos ayuda incrementar la descendencia de las hembras donadoras de embriones de alto valor genético de un hato, disminuyendo el intervalo de generación en generación. A sí mismo, nos facilita distintas actividades de mejoramiento como la evaluación de la raza y así poder tener una comparación entre grupos de animales. La TE es un proceso mediante el cual es recolectado un embrión de una hembra donante y posteriormente es transferido a una hembra receptora donde este va a completar su desarrollo (Stroud., 2012). Aun cuando existe una poca producción de crías al año, el impacto es mayor ya que se debe a la calidad genética de animales producidos (Mapletoft., 2018). Uno de los procesos biotecnológicos que se ha implementado es la superovulación (SOV), ya que en este proceso se utiliza protocolos que nos van a permitir embriones viables para realizar la transferencia alcanzado animales elite. Comúnmente previo a la superovulación se realiza una sincronización de la onda folicular con el uso de esteroides de estradiol los cuales están restringidos en su uso en la mayoría de los países desarrollados. Sin embargo, estos programas han logrado obtener un aumento relevante en la producción de embriones para transferir tanto en vacas productoras de leche como de doble propósito (Baruselli, 2006; Callejas *et al.*, 2008). Un problema a nivel mundial es la variabilidad en la respuesta superovulatoria en las vacas tratadas con gonadotropinas, ya que de un 20 a un 30% de las vacas que son sometidas a los programas de superovulación no responden al tratamiento con gonadotropinas (Lonergan *et al.*, 2011; Mogollón *et al.*, 2013), es por esto que se considera que se deben realizar estudios para mejorar la respuesta a las gonadotropinas y con ello la producción de embriones *in vivo*. En el mismo orden de ideas, otra biotecnología utilizada es la producción de embriones *in vitro* que ha experimentado un gran crecimiento en los últimos

años y ha logrado herramientas nuevas para la ciencia que son capaces de modificar y manipular el genoma de los seres vivos (Fernández *et al.*, 2007). Sin embargo, es fundamental mencionar que el desarrollo de embriones bovinos *in vitro* muestra una serie de inconvenientes en la productividad y desarrollo de estos, principalmente aquellos que se producen después el proceso de maduración y fertilización de los ovocitos *in vitro*, sin haber certeza de que el problema se deba a condiciones no optimas del cultivo de embriones o si es debido al desarrollo competitivo de los ovocitos maduros y fertilizados *in vitro*. Estos dos aspectos pueden ser combinados y producir embriones con desarrollo atrasado o con presencia de algunas anormalidades, esto tendría como consecuencia una reducción en la viabilidad del embrión (Hansen., 2006). Para realizar esta técnica existen dos formas de recolectar los ovocitos, estos pueden ser recuperados de ovarios provenientes de mataderos aclarando que en estos no se puede garantizar una calidad precisa, una elevada tasas de blastocistos y como tampoco se asegura que los ovocitos provengan de hembras de valor genético alto (a menos que se cuente con registros previamente), o de animales vivos a través de una técnica llamada aspiración folicular Mejor conocida por sus siglas en inglés, OPU (Ovum Pick-up; Herradon.,2011).

Se considera importante realizar investigaciones sobre mejorar la eficiencia de la respuesta superovulatoria en vacas sin el uso de estéres de estradiol que están prohibidos en países desarrollados y también se debe estudiar el estado de salud de las vacas donadoras de ovocitos y su efecto en la producción de embriones *in vitro*.

Hipótesis

El protocolo convencional sin el uso de benzoato de estradiol podría igualar o mejorar la tasa de producción embrionaria in vivo en vacas lecheras y de carne y la inflamación de la ubre no afecta la producción de embriones *in vitro* en ganado Holstein

Objetivo general

- Evaluar el efecto de los protocolos de sincronización en la respuesta al tratamiento superovulatorio en ganado de carne y leche, y el efecto de la mastitis sobre la competencia de los ovocitos y la producción de embriones *in vitro* en vacas productoras de leche.

Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta superovulatoria de vacas productoras de leche y carne con protocolo de sincronización sin el uso de esteres de estradiol previo a la superovulación para la producción de embriones *in vivo*.
- Evaluar la competencia ovocitaria para la producción de embriones *in vitro* obtenidos de vacas Holstein con mastitis clínica

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Regulación neuroendocrina del ciclo estral

Los animales de la especie bovino son poliéstricos continuos porque sus ciclos estrales son cada 21 días (un promedio de 17 a 24 días). Este se regula por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, donde es liberada las hormonas foliculo estimulante (FSH) y (LH) entre otras. La GnRH se produce en las neuronas e la zona ventromedial y del área preóptica del hipotálamo. Esta es secretada de dos maneras: una se da desde el centro tónico del hipotálamo en secreción pulsátil o tónica y la secreción de GnRH que con anterioridad se decía que era directamente estimulada por estradiol (E2), aunque hoy en día se conoce que las neuronas que secretan la GnRH no cuentan con receptores para estradiol por lo que es poco probable que se dé una secreción directa (Colazo, 2017). El estradiol se incrementa por el foliculo preovulatorio e induce un pico de GnRH a través de la kisspeptina, lo que permite el comportamiento estral de las hembras (Stevenson, 2007). Posteriormente, la ovulación ocurre a las 27 horas promedio (Colazo, 2017). De esta manera este conjunto de hormonas funciona por un sistema de retroalimentación positiva y negativa siendo esta la forma de guiar el ciclo estral en el ganado bovino (Stevenson, 2007).

2.1.2 Fases del ciclo estral

El ciclo estral de la vaca consta de dos fases, la folicular y la luteal; en la fase folicular del ciclo estral las concentraciones de progesterona son bajas debido a la regresión del cuerpo lúteo (CL), durante la fase luteal estas concentraciones comienzan a aumentar lo cual ocurre durante los primeros 3 a 4 días lo que corresponde al metaestro y durante esta etapa se da la formación del CL. mientras que en la etapa del diestro hay un cuerpo lúteo maduro y existe aumento en la concentración de progesterona en sangre por la cual nos ayuda a mantener la preñez o empezar un nuevo ciclo (Niswender *et al.*, 2000).

En la etapa del diestro existe crecimiento folicular en el ovario, pero estos folículos no logran ovular por que la progesterona a través de una

retroalimentación negativa sobre la GnRH solo va a permitir la secreción de LH en forma de pulsos y con mayor amplitud, pero de menor frecuencia (3 a 4 horas) siendo no favorables para que no se dé una ovulación de un folículo dominante (Rahe *et al.*, 1980). De 12 a 14 días posteriores de exposición a niveles altos séricos de progesterona, existe una regresión del CL en respuesta a la PGF secretada por el útero llegando al ovario mediante un mecanismo de contracorriente (Ginther.,1974) y de esta manera se da el inicio del proestro (Colazo, 2017).

2.1.3 Dinámica folicular

La dinámica folicular está influenciada por varios factores, entre los cuales el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-uterino juega un papel importante en la regulación hormonal, la dinámica folicular surge a partir de la primera semana de desarrollo embrionario y al nacimiento de la hembra posee un *pool* de folículos que utilizará a lo largo de su vida (Lucy *et al.*, 1992). La dinámica folicular en las vacas es un proceso continuo que ocurre durante el ciclo estral de cada vaca, con el crecimiento y degeneración del folículo antral que conduce al desarrollo folicular y la preovulación, generalmente puede ocurrir entre una a cuatro ondas de crecimiento y desarrollo folicular, con un promedio de tres a cuatro oleadas, donde el folículo preovulatorio se manifiesta en la última onda (Delgado *et al.*, 2011). Cada oleada folicular está precedida por un aumento de FSH, ya que esta activa el crecimiento sincrónico en un grupo de pequeños folículos de 3 a 4 mm de diámetro, estos folículos pasan por etapas importantes, donde un folículo seleccionado continua su crecimiento y su diferenciación para posteriormente convertirse en folículo dominante, mientras que los otros (folículos subordinados) se atresia (Bo, 2002; Bó *et al.*, 2011). El folículo dominante dura de cuatro a seis días y ovular, o sufrir atresia, dependiendo de la etapa que este el ciclo estral, cuando el folículo dominante ovula, el cuerpo lúteo se forma y produce altos niveles de progesterona, que es esencial para preparar el útero para la preñez y promover la implantación (Corrales *et al.*, 2018), pero, si el folículo dominante

sufre atresia, los niveles de FSH aumentan, provocando la aparición de una nueva oleada folicular (Adams *et al.*, 1992).

2.2 Anatomía del aparato reproductor de la hembra

Los órganos que componen el sistema reproductor de la vaca son genitales externos, vagina, cérvix, cuernos uterinos, oviductos y ovarios (Figura 1).

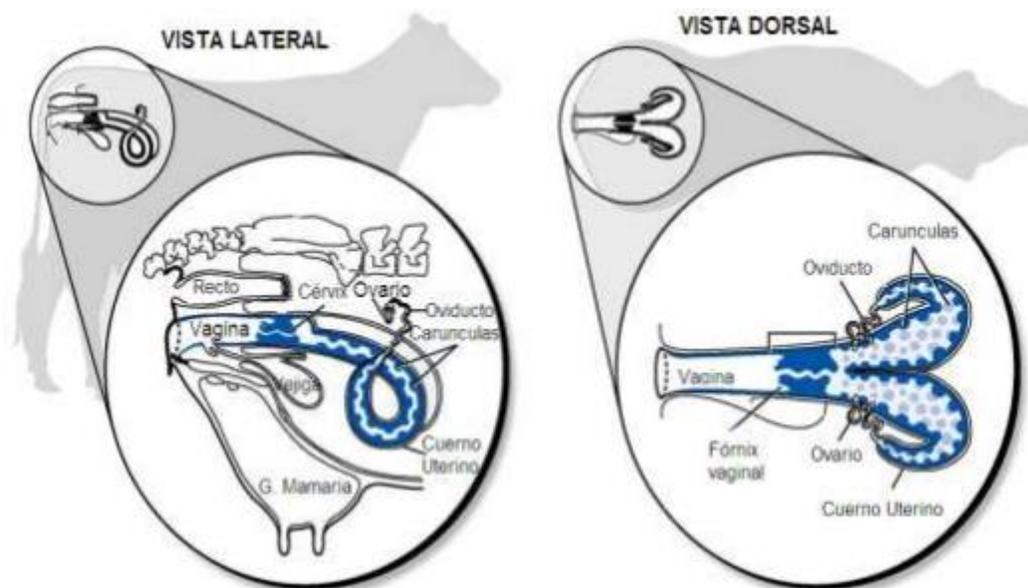


Figura 1. Esquema del aparato reproductor de la hembra bovina (Tomado de UF/IFAS., 2016)

La función de los ovarios son exocrinas (liberan el ovulo) y endocrinas (esteroidogénesis), los oviductos se encargan de la hiperactivación, fertilización y del desarrollo temprano de la pre implantación, el útero es el medio de transporte de los espermatozoides desde donde son depositados hasta el sitio de la fertilización del oviducto, el cuello uterino esta va facilitar el transporte de los espermatozoides con ayuda del moco cervical hacia la cavidad uterina y va actuar como reservorio de los espermatozoides y por último *la vagina* es el órgano copulador donde se depositan los espermatozoides (Hafez., 2002).

2.3 Protocolos de sincronización del ciclo estral

Muchos son los trabajos que existen sobre protocolos de sincronización del ciclo estral pero aún existen factores limitantes de la actividad estral, y en ocasiones

con resultados variables en la sincronización del estro o de la ovulación. Los protocolos se utilizan regularmente en los programas de inseminación artificial en momentos que se trabaja a tiempo fijo (IATF) (Colazo *et al.*, 2007) y también han resultado eficaces para sincronizar las ondas foliculares previo a la superovulación en los programas de producción de embriones *in vivo*, ya que se busca que al incorporar los protocolos de sincronización estos sean viables y faciliten el mejoramiento genético y aumenten la eficiencia en el control del ciclo estral en el ganado (Baruselli *et al.*, 2015).

2.3.1 Tratamiento convencional previo a la superovulación.

El protocolo de denominado convencional, es el tratamiento con gonadotropinas que se inicia a mitad del ciclo (8 a 12 días después de la ovulación), coincidiendo aproximadamente con la aparición de una segunda oleada folicular en vacas que tienen ciclos de dos o tres oleadas foliculares (Ginther *et al.*, 1989). En este planteamiento se tiene la necesidad de realizar la detención del estro de las vacas donantes antes de iniciar los tratamientos con gonadotropinas ya que existe una gran variación individual en el momento preciso de la segunda onda folicular. Los tratamientos SOV debe iniciarse un día anterior a la aparición de la onda folicular antes de que los folículos subordinados comiencen el proceso de atresia (Adams, 1994; Bo *et al.*, 1995). Esto se debe a que se sabe que la presencia de un folículo dominante durante los tratamientos de SOV reduce la respuesta y el rendimiento embrionario (Kim *et al.*, 2001).

2.3.2 Tratamiento con combinación de progestágenos y estradiol previo a la superovulación.

El tratamiento combinado de estradiol más progesterona han sido ampliamente utilizados en programas para sincronizar los ciclos estrales en bovinos durante más de 20 años (Macmillan y Burke, 1996; Bó y Baruselli, 2002). Este es uno de los principales tratamientos utilizados para la IATF en bovinos (Bó *et al.*, 2018). Se basan en el uso de un dispositivo intravaginal (DIV) impregnado con progesterona al inicio del tratamiento junto con benzoato de estradiol (BE)

(para sincronizar la oleada folicular), 7, 8 o 9 días después es retirado el DIV al mismo tiempo se acompaña con una aplicación de prostaglandinas (esto va a asegurar la luteolisis) 48 a 54 horas posteriores GnRH, para que dentro de las 72-84 horas la eliminación del DIV y así lograr obtener una ovulación sincronizada (Bó et al., 2002; Martínez et al., 2002). Una combinación de estradiol y progesterona funciona para suprimir la FSH. Por lo tanto, se puede lograr un mejor control de la secreción de gonadotropinas y, por lo tanto, de la dinámica folicular cuando ambos esteroides se usan juntos. (Bó et al. 1994).

2.4 Superestimulación ovárica

La superestimulación ovárica es denominada SOV y es el aumento fisiológico del número de ovulaciones que se obtiene de la misma especie, y esta se da por causa de la administración de gonadotropinas. En bovinos, se considera una respuesta significativa cuando ocurre más de dos ovulaciones. En este sentido la SOV se debe complementar con un programa óptimo de inseminación artificial usando semen de excelente calidad (Palma, 2001).

Existen investigaciones sobre la actividad biológica de las gonadotropinas esta va depender de la actividad de la FSH y LH, se pueden utilizar tres tipos de gonadotropinas para inducir la superovulación, gonadotropina de extracto de pituitaria de cerda y otros animales domésticos, la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la hormona coriónica Humana (hCG) (Mapletoft et al., 2002; Murphy, 2018).

Se estima que la vida media de la FSH en vacas En promedio es de 5 horas, por lo que se administra dos veces al día para lograr una superovulación exitosa y por ende obtener una excelente cantidad y calidad de embriones. Por lo general la FSH es administrada en un rango de 4 a 5 días (dos veces por día AM y PM). A las 48 o 72 horas de iniciado el tratamiento se aplica prostaglandinas de esta manera se induce la luteolisis, y entre 36 y 48 horas se produce el celo seguido de la ovulación a las 24 y 36 horas (Mapletoft *et al.*, 2002).

2.4.1 Protocolos de superovulación en bovinos

La respuesta a los tratamientos sigue variando ya que es difícil predecir una buena respuesta a ellos. Esto se da por que se trabaja con organismos vivos que aun siendo de la misma especie llegan a tener variables respuestas fisiológicas y se afrontan a un medio que también puede ser parte influyente en la respuesta del mismo animal (Mapletof *et al.*, 1994).

Como todo proceso estos protocolos tienen sus limitaciones como son: 1) la detección de un calor de la vaca donante para poder establecer un “estro base” para desarrollar el del protocolo que se desea establecer. 2) Desarrollo de ondas foliculares y momento adecuado para iniciar el tratamiento de SOV. 3) la necesidad de detectar el estro en tiempo y forma para la IA. 4) Entre el 20 al 30% de las vacas donadoras no responden al tratamiento de SOV (Baruselli *et al.*, 2006).

La SOV consiste en la producción de un gran número de embriones que tengan las cualidades de poder ser transferibles y por consecuencia nos conlleve a tener una alta probabilidad de preñez. A un que la respuesta que se obtiene a través de estos tratamientos puede ser variables y esto se debe a que se trabaja con organismos biológicos a un que sea de una misma especie se obtienen respuestas variables (Mapletof *et al.*, 1994).

2.4.2 Algunos factores que afectan la superovulación

A pesar de muchos años de investigaciones sobre tratamientos superovulatorios para transferencia de embriones, aún existen muchas limitaciones que afectan los procedimientos para obtener mejores resultados, ejemplo de ello es la variabilidad de la respuesta superovulatoria que existe entre donantes de embriones (Surjus *et al.*, 2014). Hay varios factores que pueden afectar la respuesta de SOV como en la producción de embriones, estos pueden ser clasificados en intrínsecos y factores extrínsecos dentro de los primeros se consideran los fisiológicos como son raza, edad, condición corporal, estado de salud como reproductivo etc. A un que se consideran externos el tipo, dosis y

pureza de las hormonas utilizadas. El método y lugar de aplicación, la duración y la estación del año (Mogallón *et al.*, 2013).

2.4.2.1 Estrés calórico

Es el proceso por el cual los animales no cuentan con la capacidad de disipar el calor y mantener su equilibrio térmico (Sammad *et al.*, 2019). Y esto es debido a las temperaturas altas y la humedad en el ambiente, a la radiación térmica y a al calor metabólico principalmente las vacas productoras de leche (Jeenali *et al.*, 2019). El estrés calórico afecta directamente sobre los procesos biológicos y es directamente sobre la tasa de concepción en las vacas (Sartori *et al.*, 2002).

Se ha documentado que el estrés calórico tiene efectos directos o indirectos sobre el aparato reproductor sobre todo en el eje Hipotálamo-pituitario-ovárico (Wolfenson y Roth, 2019; Roth, 2021). Existen estudios que demuestran que un aumento en la temperatura corporal puede afectar directamente alterando la dinámica folicular de manera particular en el reclutamiento, selección de folículos primarios y así afectar el crecimiento de un folículo dominante o preovulatorio (Roth, 2008 y Edwards *et al.*, 2009). El estrés calórico también nos afecta en la función folicular causando una baja producción de la hormona esteroidegenicas de los folículos (Bandinga *et al.*, 1993), esto se da por la disminución de la actividad en la enzima aromatasa sobre la célula de la granulosa y por una baja concentración de estradiol en el líquido folicular del folículo dominante (Roth,2015). Y esto se puede asociar con la poca expresión de celo en la vaca.

2.4.2.2 Claudicación

Se ha documentado en un par de trabajos comparando la existencia de una baja fertilidad en vacas altas productoras de leche con y sin problemas de claudicación (Fourichon *et al* 2000, Meléndez *et al* 2003). Sin embargo, existen reporte de que las vacas con problemas de claudicación independientemente del factor muestras muestran intervalos más largos desde el parto hasta el primer servicio y la concepción (Meléndez *et al* 2003, Hernández *et al* 2005). Y esto se relaciona con el balance energético negativo, el dolor y la insuficiencia hormonal, el retraso

en la ciclicidad, mayor incidencia de quistes ováricos y esto conlleva a una reducción de la ovulación (Garbarino et al 2004; Morris et al 2009).

Por lo tanto, en base a estudios han desmostado que la laminitis es un factor que se clasifica como una de las causas de ser más dañina para el desempeño reproductivo que otras lesiones en la pezuña de los bovinos (Mellado *et al* 2018).

2.4.2.3 Inflamación

Desempeña un papel muy importante y esencial para la reproducción exitosa de las vacas ya que los procesos inflamatorios están asociados en cada proceso de la fertilidad (ciclo estral, ovulación, desarrollo del cuerpo lúteo, luteólisis), preñez prematura, (reconocimiento materno de la preñes) e involución uterina posparto (Chastant *et al* 2018). Los mediadores de la inflamación como es el cortisol, citoquinas, interleucinas, Prostaglandinas F2 α y el óxido nítrico ocasionan una baja secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y en consecuencia existe una disminución de la secreción de la hormona gonadotropina (FSH), y la hormona luteinizante (LH) y a si mismo hay una disminución en los niveles de estradiol (Schrick *et al.*,2001; Hansen *et al.*,2004)

La inflamación excesiva o persistente tiene un efecto deletéreo sobre la fertilidad y esto es debido a las citoquinas en la circulación general, los ovarios, el útero y los embriones pueden estar algo contaminados por sitios distantes como mastitis, inflamación podal, inflamación digestiva todas muy prevalente en vacas lecheras. Todas estas enfermedades inflamatorias afectan muchos avances en los procesos reproductivos como son: la síntesis de GnRH y LH, la foliculogénesis, la esteroidogénesis folicular, la calidad de los ovocitos, la ovulación, la expresión del estro, la calidad y la vida útil del cuerpo lúteo, la fertilización el desarrollo y supervivencia del embrión (Ribeiro *et al.*, 2017).

2.4.2.4 Mastitis

La mastitis de forma natural provoca un desempeño no favorable en el funcionamiento reproductivo en las vacas, esto es debido a las endotoxinas como polisacáridos que generan las bacterias gram negativas que produce la mastitis ayudan a la síntesis de prostaglandinas y eleva el nivel de cortisol (Sugino,2006).

De esta manera provoca alteraciones en el eje hipotálamo-pituitario en la baja secreción de hormonas responsables de la maduración de los ovocitos, la ovulación y la formación de cuerpo lúteo (Schick *et al.*, 2001).

También es caracterizada por cambios físicos, químicos y generalmente bacteriológicos en la leche, además de provocar alteraciones patológicas en los tejidos de glándula mamaria y en lo reproductivo (Sharma, 2007). La activación de la respuesta inflamatoria en la ubre conduce a ciclos estrales anormales, también anovulaciones en el estro, fracasos al momento de la fertilización o muerte embrionaria (Moore *et al* 2005). Estas moléculas bioactivas que existen en la glándula mamaria de la vaca que se encuentra afectada por mastitis (TNF- α , NO, and PGF2- α entre otros) son liberados al torrente sanguíneo teniendo la capacidad de alterar los tejidos que están involucrados en la reproducción, como el ovario, hipotálamo, y endometrio (Nugent *et al* 2002; Herath *et al* 2007; Herath *et al* 2009). De la misma manera, el crecimiento de los folículos, desarrollo de los ovocitos y embriones también se ven afectados por la acción de estas toxinas (Soto *et al* 2003; Herath *et al* 2007).

2.5 Situación actual de la producción de embriones en bovinos

Según el Comité de Recuperación de Datos (DRC, por sus siglas en ingles) de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS, por sus siglas en ingles) que se encarga de recopilar, organizar y publicar las estadísticas de la industria de embriones en animales domésticos de granja, esta muestra datos sobre las actividades globales relacionadas con la recolección y transferencia de embriones *in vivo* e *in vitro* en Europa y América de acuerdo a una exhaustividad de los datos de TE de estas regiones permitiendo a si la caracterización de las principales tendencias de la industria de ET a lo largo de los años. La producción total de a nivel mundial de embriones bovinos de leche como de carne (Viana, 2019).

2.5.1 Producción de embriones *in vivo*

Esta técnica fue desarrollada en los años setenta y se basa básicamente en la superestimulación ovárica, lo que hace que la hembra donante ovule varias

veces en lugar de una sola ovulación que tiene de forma natural. Las hembras son inseminadas y los embriones son desarrollados en el útero siete días posteriores son extraído por medio de un lavado uterino que es realiza siete días después de la última inseminación artificial como se muestra en la figura (Machaty *et al.*, 2012).

Los embriones extraídos se pueden transferir a una hembra receptora que lleve la gestación a buen término o se criopreservarán para su uso posterior. De estos procesos, la congelación es la más adecuada para los embriones obtenidos in vivo.

Al principio este procedimiento de extracción y transferencia de embriones se realizaba quirúrgicamente. Después de los años ochenta se realizan procedimientos de lavado y transferencia no quirúrgica (vía transcervical) permitiendo la difusión de la técnica. Según datos de la IETS (“International Embryo Transfer Society”) has el 2021 esta técnica ya fue superada por producción in vitro de embriones ya que informo que la producción in vivo fue de 361.728 embriones obtenidos in vivo contra 1.200.000 obtenidos mediante la técnica de producción de embriones obtenidos *in vitro* (Viana., 2021).

Sin embargo, existen trabajos donde nos mencionan que en la transferencia de embriones el porcentaje de fertilidad oscila de 50 a 60% con embriones frescos y 40 a 50% con embriones congelados (Zárate *et al.*,2018).

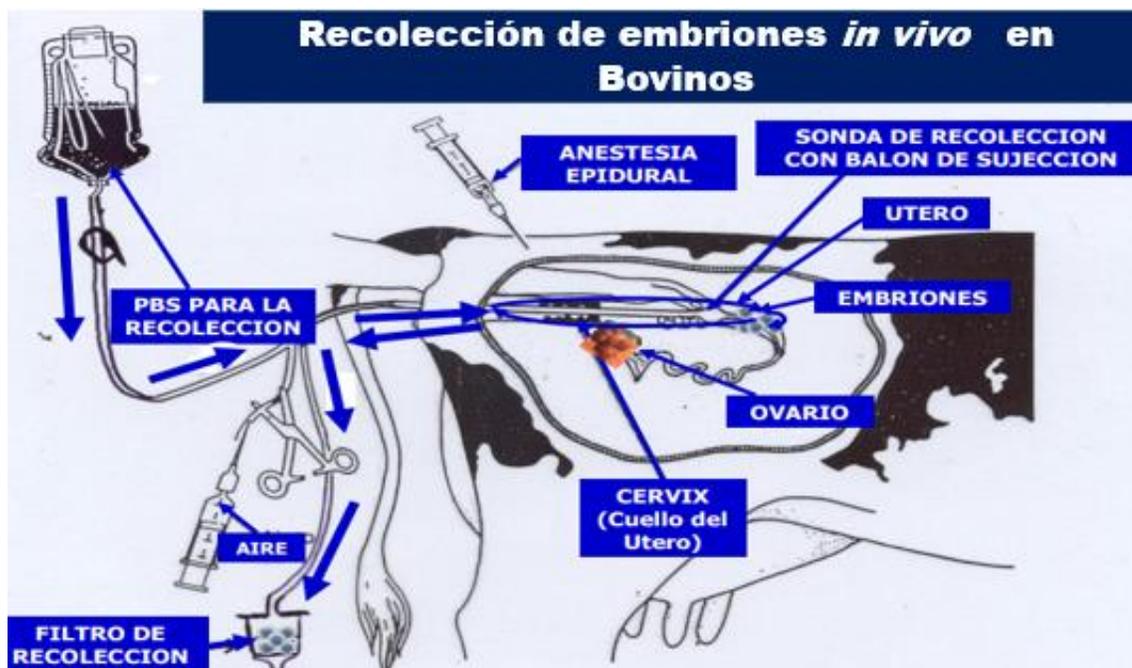


Figura 2. Esquema de proceso de recolección de embriones con la técnica de lavado uterino (tomado de Robertson et al.,2015).

2.5.2 Producción de embriones *in vitro*

Es una herramienta en los programas de TE para el mejoramiento genético en el ganado bovino, el cual consiste en aprovechar los ovocitos de las vacas de alto valor genético e incluso de animales sacrificados, independientemente del fin zootécnico (producción de leche o producción de carne) por medio de aspiración folicular guiada Ovum -Pick Up (Pontes et al., 2010; Blondin, 2017). La industria productora de embriones IETS (“International Embryo Transfer Society”) en el 2021 informo que se han producido un mayor récord en embriones bovinos producido *in vitro* (1.200.000) a superando a los embriones que se producen *in vivo* (361.728) esta tendencia se observó por primera vez en 2016, basado en datos de países de todo el mundo que informan voluntariamente al IETS (Viana., 2021). Los ovocitos o los ovarios que son recuperados son trasladados al laboratorio, estos se encuentran en un estadio inmaduro y deben ser madurados *in vitro* en el laboratorio para estar en condiciones de ser fecundados. Con una dosis de semen de alto valor, se puede generar un gran número de embriones.

Los embriones obtenidos son cultivados en una incubadora, siete días posteriores (edad del embrión bovino) pueden transferirse a una vaca receptora o criopreservarse para transferirlos en un momento específico (Fernández *et al.*, 2007). Es importante resaltar que los embriones que se producen *in vitro* parte de animales que no han sido tratados hormonalmente a diferencia de la producción *in vivo*, de la misma manera se requiere de menor dosis de semen para la inseminación (*in vivo*) que para la fecundación (*in vitro*) y el costo es mayor en la producción *in vivo*.

2.6 Ventajas y desventajas de la transferencia de embriones en bovinos

2.6.1 Ventajas de la transferencia de embriones

La ventaja de esta biotecnología es básicamente obtener una descendencia de genética superior, disminuir el riesgo de contagio de enfermedades infecciosas y a sí mismo en lo reproductivo de las hembras donantes. Otra ventaja es el uso de vientres de animales sanos pero que carecen en cuanto a genética (Bó *et al.*, 2002). También nos permite intercambiar genética a nivel nacional e internacional realizando la incorporación de razas que no existan en algún país e incluso el transporte de hatos completos en forma de embriones congelados. De la misma manera nos permite tener más de una descendencia por cada embrión e incluso nos permite emplear vacas donantes con alto valor genético que sean de edad avanzada o que constantemente sufran de algunas enfermedades infecciosas (Mastitis, cojeras etc.) mediante una receptora sana para poder tener crías sanas de alta calidad y con excelente genética (Brito.,1999).

2.6.2 Desventajas de la transferencia de embriones

A sí como se puede obtener prole con rasgos deseables (leche y carne) provenientes de animales con valor genético alto, también se pueden aumentar con facilidad las características indeseables de animales que no son aptos para introducir en un programa de TE. Por ello, es importante conocer el uso de dichas técnicas y recibir asesoramiento de personal capacitado para efectuarlo; otra desventaja es que debe ser evaluada la variabilidad que presentan los animales en materia de resultados antes de la aplicación de esta técnica, en tales

programas la disponibilidad de hembras receptoras ideales es baja y el costo de las hormonas para controlar el ciclo estral del animal y las ovulaciones múltiples es alto. Otro inconveniente es la necesidad de personal capacitado (técnico) para evitar una disminución en la eficiencia de la técnica, ya que sus resultados pueden variar (Bó., 2003). Otra desventaja es la variación en la calidad de los embriones que conlleva la aplicación de este tipo de técnica, aunado y considerando que entre un 20 a 30% de las donantes de embriones no responden a los tratamientos con hormonas gonadotropinas en caso de SOV, la variabilidad de esta respuesta dependerá de cada individuo y a los factores involucrados a la dinámica folicular en los animales (Baruselli *et al.*,2006; Bó.,2018). Y esto hace que no se tenga éxito en la recuperación de embriones que se puedan ser transferibles.

2.7 Selección y manejo de la vaca donante y receptora de embriones

2.7.1 Donadora

Es probable que el criterio de selección para los animales que van hacer utilizadas como donadoras difieran según el motivo por el que se realiza la TE. Esta selección se debe basar cuando menos en tres puntos de vista que son los más importantes: Excelencia genética, amplitud reproductiva y el valor de la progenie en el mercado (Fufa *et al.*,2016). Además, las hembras seleccionadas como donantes de embriones deben tener ciclos estrales regulares desde su etapa reproductiva, que no allá requerido más de dos inseminaciones por concepción, sin defectos de conformación o genéticos detectables y de entre 3 a 10 año de edad, sin alteraciones patológicas en el aparato reproductor (quistes, adherencias, infecciones, etc.) con buena condición corporal, en promedio 3 a 3.5 en una escala de 1 a 5 (Alberio., 2001). La hembra donante debe tener una alimentación balanceada antes de realizar los procesos de SOV, donde se debe pretender la administración de forrajes que brinden al animal nutrientes necesarios para que le permita cumplir con las funciones reproductivas, de la misma manera incorporar ciertos productos como vitaminas y minerales que proporcionen al animal adecuados niveles de energía (Gomez,2005). De esta misma manera, es necesario determinar que la hembra

donante tenga un periodo posparto promedio de 60 días para poder garantizar una efectiva involución uterina y tenga una buena respuesta en sus ciclos estrales (Gonzalez.,2001).

2.7.2. Receptora

Debe ser una hembra que deberá tener la capacidad de recibir el embrión y llevarlo a buen término. En efecto debe tener un buen tamaño en forma general y debe estar sana reproductivamente, con buena capacidad dependiendo del propósito que este sea (productora de leche o productora de carne). Otra de las cosas con lo que debe contar una buena receptora es la edad, es mejor una vaquilla que una vaca que ya allá tenido un parto ya que la vaquilla permite tener mejores resultados en la tasa de preñez que una vaca adulta, sin embargo probablemente se enfrentaría con dificultades durante la gestación, el parto y la lactancia y esto nos conlleva a tener resultados al final muy inferiores a las de una vaca adulta, estas que se conoce su historial reproductivo, sumando tener menos complicaciones en el parto hace que estas sean los animales de elección.

III. LITERATURA CITADA

- Adams, G.P., 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology* 41, 19–24.
- Alberio, R., 2001. Manejo de donantes y receptoras. *Biotecnología de la reproducción*. Primera edición. Editorial Argentina. Pp. 18-23.
- Badinga, L., Thatcher, WW., Diaz, T., Drost, M., and Wolfenson, D. 1993. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*. 39; 797–810. doi:10.1016/0093-691x(93)90419-6
- Baruselli PS, de Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bó GA 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. Jan 7;65(1):77-88. Epub 2005 Nov 14. Review
- Baruselli, P. S., Marques, M. O., Vieira, L. M., Konrad, J. L., & Crudeli, G. A. (2015). Aplicación de biotecnologías para una mayor producción de terneros. *Revista veterinaria*, 26(2), 154-159.
- Blondin, P. (2017). Logistics of large scale commercial IVF embryo production. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(1), 32-36.
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2018). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction (AR)*, 10(3), 344-348.
- Bo, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A., Tribulo, H. E., Caccia, M., & Mapletoft, R. J. (1994). Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, 41(8), 1555-1569.
- Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., ... & Mapletoft, R. J. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57(1), 53-72.

- Bó, G. A., Tríbulo, A., & MAPLETOFT, R. (2011). Nuevos protocolos de superovulación para programas de transferencia de embriones en bovinos. *Spermova*, 1(1), 26-33.
- Bó, G.; Moreno, D.; Cuaita, L.; Caccia, M., 2003 "Factores que afectan los porcentajes de preñez en los programas de transferencia de embriones". IV Seminario internacional de reproducción de grandes animales. CGR. Bogotá Colombia.
- Bo, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J., 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43, 31–40.
- Brito Capallejas R.,1999. Fisiología de la Reproduccion Animal con elementos de Biotecnología" Editorial Felix Varela., Pp. 254- 261.
- Callejas, S.; Cabodevila, J.; Palma, G.; alberio, R. H.; Torquati, S.; Butler, H. et al. (2008). Evaluación de los Embriones Bovinos. En Memorias del curso de superovulación y transferencia de embriones bovinos. Mar del Plata, Argentina: INTA Balcarce.
- Chastant, S., & Saint-Dizier, M. (2019). Inflammation: friend or foe of bovine reproduction?. *Animal Reproduction*, 16, 539-547.
- Colazo, M. G., & Mapletoff, R. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos.
- Colazo, M. G., & Mapletoft, R. (2017). Fisiología del ciclo estral bovino. *Ciencia Veterinaria*, 16(2).criopreservados. *Agro ciencia*, 52, 21–32. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6745306>.
- Corrales, A. S., de Armas, R., Morales, J., & García, R. D. (2018). ESTUDIO DE LA DINÁMICA FOLICULAR EN NOVILLAS SIMMENTAL FLECKVIEH. *Revista Investigaciones Agropecuarias*, 1(1), 56-66.
- Delgado, P. A. M., Cuélla, N. R., Sánchez, C. M. G., & Rojas, E. C. C. (2011). Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)*, 5(2), 88-99.

- Edwards, J.L., Bogart, A.N., Rispoli, L.A., Saxton, M.A., and Schrick, F.N. 2009. Developmental competence of bovine embryos from heat-stressed ova. *J. Dairy Sci.* 92; 563-570.
- Fernández, A., Díaz, T., & Muñoz, G. (2007). Producción in vitro de embriones bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 48(1), 51-60.
- Fourichon, C., Seegers, H., & Malher, X. (2000). Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology*, 53(9), 1729-1759.
- Fufa, N., Abera, D. & Kabeta, T. (2016). Review on bovine embryo transfer. *European Journal of Biological Science*, 8(3), 79-84.
- Garbarino, E.J, Hernández, J.A, Shearer, J.K, Risco, C.A, Thatcher, W.W. 2004. Effect of lameness on ovarian activity in postpartum Holstein cows. *J Dairy Sci* 87, 4123-4131.
- Ginther, O. J., Kastelic, J. P., & Knopf, L. (1989). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 20(3), 187-200.
- Gómez, C., 2005. "Transferencia de embriones experiencias en Colombia". Memorias, congreso internacional de reproducción bovina. INTERVET Bogota. Colombia.
- Gonzales-Stagnaro, C. Reproducción bovina. Venezuela: Fundación Giraraz, 2001.
- Hafez, E. S. E. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. McGraw-Hill Interamericana.
- Hansen JP, Soto P, Natzke PR. (2004) Mastitis and Fertility in Cattle - Possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *AJRI*; 51:294- 301.
- Hansen, P. J. (2006). Realizing the promise of IVF in cattle—an overview. *Theriogenology*, 65(1), 119-125.
- Herath, S., S. T. Lilly, D. P. Fischer, E. J. Williams, H. Dobson, C. E. Bryant, and I. M. Sheldon. (2009). Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from

- prostaglandin F2 α to prostaglandin E2 in bovine endometrium. *Endocrinology* 150:1912–1920.
- Herath, S., Williams, E. J., Lilly, S. T., Gilbert, R. O., Dobson, H., Bryant, C. E., & Sheldon, I. M. (2007). Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction*, 134(5), 683-693.
- Hernández, JA, Garbarino, EJ, Shearer, JK, Risco, CA, Thatcher, WW. 2005. Comparison of milk yield in dairy cows with different degrees of lameness. *J Am Vet Med Assoc* 227, 1292-1296.
- Herradon. PG. Quintela. L. Becerra. J.J. Fernandez. M. (2011). Fecundación in vitro: Alternativa para la mejora genética en bovinos
- Hirayama, H., Naito, A., Fujii, T., Sugimoto, M., Takedomi, T., Moriyasu, S., ... & Kageyama, S. (2019). Effects of genetic background on responses to superovulation in Japanese Black cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 18-0537.
- Jeelani, R., Konwar, D., Khan, A., Kumar, D., Chakraborty, D., y Brahma, B. (2019). Reassessment of temperature-humidity index for measuring heat stress in crossbred dairy cattle of a sub-tropical region. *Journal of thermal biology*. 82; 99-106.
- Kim, I.H., Son, D.S., Yeon, S.H., Choi, S.H., Park, S.B., Ryu, I.S., Suh, G.H., Lee, D.W., Lee, C.S., Lee, H.J., Yoon, J.T., 2001. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 55, 937–945.
- Lucy, M. C., Savio, J. D., Badinga, L., De La Sota, R. L., & Thatcher, W. W. (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of animal science*, 70(11), 3615-3626.
- Machaty Z, Peippo J and Peter A. (2012): Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. *Theriogenology* 78: 937-950 Mapletoft R.J.

- (1985). Embryo transfer in the cow: General procedures. *Rev sci tech Off int Epiz.* 4:843-858.
- Macmillan, K. L., & Burke, C. R. (1996). Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 307-320.
- Mapletoft, R. J. (2018). History and perspectives on bovine embryo transfer. *Animal Reproduction (AR)*, 10(3), 168-173.
- Mapletoft, R.J.; Bo, G.A.; Campo, M.R. (1994). Factores que afectan la superovulación en la vaca: consideraciones prácticas. *Bovis, JUN*; (58) 31-49.
- Martinez, M. F., Kastelic, J. P., Adams, G. P., & Mapletoft, R. J. (2002). The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH, or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. *Journal of animal science*, 80(7), 1746-1751.
- Meléndez, P, Bartolomé, J, Archbald, LF, Donovan, A. 2003. The association between lameness, ovarian cysts and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology* 59, 927-937.
- Mellado, M., García, J. E., Véliz Deras, F. G., de Santiago, M. D. L. Á., Mellado, J., Gaytán, L. R., & Ángel-García, O. (2018). The effects of periparturient events, mastitis, lameness and ketosis on reproductive performance of Holstein cows in a hot environment. *Austral journal of veterinary sciences*, 50(1), 1-8.
- Mogollón Waltero, Édgar M., & Burla Días, A. J. (2013). Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH. *Spei Domus*, 9(18). <https://doi.org/10.16925/sp.v9i18.545>.
- Moore DA, Overton MW, Chebel RC, Truscott ML, BonDurant RH (2005). Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*; 226:1112-1118.
- Morris, MJ, Walker, SL, Jones, DN, Routly, JE, Smith, RF, Dobson, H. (2009). Influence of somatic cell count, body condition and lameness on follicular growth and ovulation in dairy cows. *Theriogenology* 71, 801-806.

- Murphy, B. D. (2018). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction (AR)*, 9(3), 223-230.
- Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., & McIntush, E. W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological reviews*, 80(1), 1-29.
- Nugent AM, Hatler TB, Silvia WJ. (2002). The effect of the intramammary infusion of Escherichia coli endotoxin on ovulation in lactating dairy cows. *Reprod Biol* 2, 295-309.
- Palma G. A. 2001. *Biología de la Reproducción*. Minera El Paraíso S.A. Argentina. 79,125,127p
- Pontes, J. H. F., Silva, K. C. F., Basso, A. C., Rigo, A. G., Ferreira, C. R., Santos, G. M. G., ... & Seneda, M. M. (2010). Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from Bos taurus, Bos indicus, and indicus-taurus dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, 74(8), 1349-1355.
- Rahe, C. H., Owens, R. E., Fleeger, J. L., Newton, H. J., & Harms, P. G. (1980). Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology*, 107(2), 498-503.
- Ribeiro E S, Carvalho M R. (2017). Impact and mechanisms of inflammatory diseases on embryonic development and fertility in cattle. *Anim Reprod*, 14:589-600.
- Robertson E. Embryo collection and transfer (2015). En: *bovine reproduction*, 1a ed. Sección III, capítulo 76 (703-717).
- Roth, Z. (2008). Heat Stress, the Follicle, and Its Enclosed Oocyte: Mechanisms and Potential Strategies to Improve Fertility in Dairy Cows. *Reprod Dom Anim*. 43; 238–244.
- Roth, Z. (2015). Physiology and endocrinology symposium: Cellular and molecular mechanisms of heat stress related to bovine ovarian function. *Journal of animal science*. 93(5); 2034-2044.

- Roth, Z. (2021). Heat stress reduces maturation and developmental capacity in bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*. 33; 66-75.
- Sammad, A., Umer, S., Shi, R., Zhu, H., Zhao, X., Wang, Y. (2019). Dairy cow reproduction under the influence of heat stress. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. doi: 10.1111/jpn.13257. Epub 2019 Nov 29. PMID: 31782564.
- Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, SA., Guenther, JN., Parrish, JJ., Wiltbank, MC. (2002). Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. *Journal of Dairy Science*. 85 (11); 2803-2812.
- Schrack FN, Hockett ME, Saxton AM, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver SP (2001). Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J Dairy Sci*; 112:273-282.
- Sharma, N. (2007). Alternative approach to control intramammary infection in dairy cows-A review. *Asian J. Anim. Vet. Adv*, 2(2), 50-62.
- Soto P, Natzke RP, Hansen PJ. (2003). Actions of Tumor Necrosis Factor- α on Oocyte Maturation and Embryonic Development in Cattle 1. *Am J Reprod Immunol*; 50(5):380-388.
- Stevenson JS. (2007). Clinical reproductive physiology. In: Youngquist RS, Threlfall WR editors. *Large Animal Theriogenology 2*. St. Louis, Missouri: Saunders, 258-270
- Stroud, B. IETS., (2012). Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer News Letter*, 30, 16- 26.
- Sugino. (2006). Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Anim Sci J* 2006; 77:556-565.
- Surjus, R. S., Prata, A. B., Borsato, M., Mattos, F. C., da Silveira, M. C. M., Mourão, G. B., & Sartori, R. (2014). In vivo embryo production in cows superovulated 1 or 2 days after ovum pick-up. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(4), 527-532.

- UF/IFAS. (2016). Anatomía Reproductiva de la vaca en gestación. [http://animal.ifas.ufl.edu/ans3319/lab_notes\(docs/lab_1d_female_reproductive%20_anatomy.pdf](http://animal.ifas.ufl.edu/ans3319/lab_notes(docs/lab_1d_female_reproductive%20_anatomy.pdf) (15 de Julio de 2015).
- Viana, J. (2019). Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. Embryo Technology Newsletter, v. 38, n.4, 2020
- Viana, J. H. M. (2021). Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: World embryo industry grows despite the Pandemic. Embryo Technol. Newsl, 39(4).
- Wolfenson, D., and Roth, Z. (2019). Impact of heat stress on cow reproduction and fertility, Animal Frontiers. 9(1); 32–38. <https://doi.org/10.1093/af/vfy027>
- Zárate-Guevara, O., Jadiel, L., Cisneros Prado, R., Canseco Sedano , F., Montiel Palacios, A., Carrasco, G. (2018). Transferencia de embriones bovinos

ESTUDIO 1

ARTICULO 1: Ovulatory response of Beef and Dairy cows subjected to two follicular emergence synchronization protocols before superovulation



Ovulatory response of Beef and Dairy cows subjected to two follicular emergence synchronization protocols before superovulation

M A GONZÁLEZ RAMOS¹, O ÁNGEL GARCÍA¹, F G VELIZ DERAS², L R GAYTÁN,
 J M GUILLEN-MUÑOZ¹, A SOLÍS CORRALES², H Z GUERRERO-GALLEGO¹ and J L MORALES-CRUZ^{1*}

Autonomous Agrarian University Antonio Narro UL, Torreón, Coahuila, Mexico

Received: 22 September 2022; Accepted: 20 January 2023

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the superovulation response of Beef and Dairy donor cows to two different follicular emergence synchronization protocols. Twenty-two beef and dairy cows were divided into two groups: Conventional group ($n=8$) four Holsteins and four Charolais cows between days 10 and 11 of their estrous cycle and IVD+EB group ($n=14$) with six Holsteins and eight Charolais cows treated with an intravaginal device (IVD) containing 1.9 g of P4+2 mg of estradiol benzoate (EB) between days 10 and 11 of their estrous cycle. The superovulation protocol consisted of intramuscular application of pFSH twice a day for four days, in decreasing doses (850 IU for Dairy cows and 500 IU for Beef cows). The number of follicles (13 ± 1.1 vs. 7.5 ± 0.9) and embryos collected (11.7 ± 2.1 vs. 6.1 ± 1.0) were significantly affected by the treatment in the Beef cows but, the protocols did not significantly affect these variables in Dairy cows (12.2 ± 0.9 vs. 10.4 ± 0.7 , respectively). Regarding the production of non-viable embryos, a significant difference was only found in the group of Beef cows for both treatments (8.2 ± 2.3 vs. 1.3 ± 0.3 , respectively). Results showed that IVD+BE is not necessary for the superstimulation of the emergence of a new follicular wave before superovulation when it starts in the mid-luteal phase of the estrous cycle in Holstein cows and beef cows, since they were found to have similar results without significant differences between both treatments.

Keywords: Biotechnology, Cattle, Embryo Transfer, Embryos, Superovulation

Superovulation protocols (SOV) favour the development of *in vivo* embryo production for breeding programs and improve cattle's reproductive efficiency (Alkan *et al.* 2020). These programs have significantly increased the production of transferable embryos in dairy, beef, and dual-purpose cows (Barucelli 2006, Callejas *et al.* 2008). The SOV includes the management of endocrine processes through hormonal treatments, mainly based on gonadotropins to control the estrous cycle until the ovulation of the dominant follicles (Soria 2017). However, variability in SOV response and embryo viability has been reported. It has been documented that around 20 to 30% of cows subjected to superovulation treatments do not respond (Lonergan *et al.* 2011, Mogollón *et al.* 2019). One of the factors that undoubtedly have a great effect on the SOV response of donor females is the timing of the emergence of a new follicular wave, that is, such a response depends mainly on the number of follicles sensitive to gonadotropins present in the donor at SOV. Traditionally, when the SOV protocol (conventional protocol) was

started, it was between days 8 and 12 of the estrous cycle corresponding to the middle luteal phase of the donor female, approximately coinciding with the appearance of the second follicular wave. However, a limitation of this protocol was the strict monitoring and observation of the start of the estrous cycle (estrus) of the donor females, since this event was of the utmost importance for the start of the SOV protocol. In this same sense, in the 1990s, the use of progestogens and estradiol to induce the synchronous appearance of a new follicular wave was reported (Bó *et al.* 1995), without considering the stage of the estrous cycle and without considering the need to observe estrus or wait for 8 to 12 days to start the SOV protocol (Soria *et al.* 2017). However, one of the greatest limitations to the use of this method is the use of estradiol, since in many countries this hormone is prohibited, due to the residues of these steroid hormones in the food chain (Lane *et al.* 2008, Mapletoft *et al.* 2018). Therefore, this study was designed to compare the response of dairy cows and beef donor cows to embryos with or without progesterone plus estradiol benzoate (EB). Although recent studies report good superovulation results using Progesterone plus EB, we hypothesize that the conventional protocol without progesterone and EB could match or improve the rate of embryonic production in dairy and beef cows.

Present address: Autonomous Agrarian University Antonio Narro UL Faculty of Agricultural Sciences, University of Panama. ✉Corresponding author email: moralesnarrojl@gmail.com

MATERIALS AND METHODS

The management of the experimental units used in this study was in strict accordance with the guidelines for the ethical use, care, and welfare of animals in research at the international level (FASS, 2010), national levels (NAM, 2002), and institutional with reference number UAAAN-UL/005/22-BO-PR-LN.

The study on Holstein cattle was carried out on a commercial dairy farm in the Comarca Lagunera (25° 44' 36" N and 103° 10' 15" W) which is characterized by an extremely hot climate, with maximum temperatures in summer of 43°C, and in winter 2 to 9°C. The average annual rainfall is 240 mm and the relative humidity ranges from 29 to 83%; the altitude is 1,111 meters above sea level (CONAGUA 2015). While the study on Beef cattle was carried out on a commercial cattle ranch of the Angus breed (27°46'N, 105°43'W), the area is characterized by a very dry semi-warm climate, which ranges from 18 to 20°C, with a rainfall of 200 to 400 mm and an altitude of between 1,100 and 1,400 meters above sea level (INEGI 2020).

Experimental animals: Twenty-two cows were used, 10 Dairy cows and 12 Beef cows divided first according to their zootechnical function and then randomly assigned to one of the two follicular wave synchronization protocols. The first group was Holstein cattle (n=10) in which six (6) Holstein cows were synchronized with a protocol where a device (IVD) with progesterone (CDR®, Zoetis, Mexico) and estradiol benzoate (EB) was used, and 4 Holstein cows synchronized with a protocol without IVD or EB (conventional). While in Angus cattle (n=12) 8 cows were synchronized with the IVD+EB protocol and 4 cows synchronized with the conventional protocol.

Holstein cows had a body condition score (BCS) of 2.75 to 3.5 on a scale of 1 to 5 (Lowman *et al.* 1976), and Angus cows had a BCS of 4 to 5 on a scale of 1 to 9 (Hall *et al.* 2000), with an age of 40 to 60 months, with more than 90 days postpartum and clinically healthy, without having had any pathological alteration in the genital organs during their reproductive life. All the cows were managed under the same environmental and nutritional conditions according to their exploitation system.

Treatments

DIV + EB: In this protocol, on day seven of the estrous cycle, cows received an intravaginal device (IVD) impregnated with 1.9 g of progesterone (CDR®, Zoetis, Mexico), followed by the application of 2 mg of estradiol benzoate (BE; Sincrodiol®, Eurofino, Mexico) intramuscularly (IM), the SOV protocol began on day eleven of the estrous cycle prior to this, on day ten an ultrasound was performed to detect the presence of the corpus luteum (CL). Superovulation treatment was performed by applying decreasing doses of porcine follicle-stimulating hormone (FSHP; Pluset®, Calier, Spain) and on day fourteen the IVD was removed as shown in Fig.1.

Conventional protocol (without IVD or EB): Day zero (D0) was established as the day when cows showed signs of heat. On day ten of the estrous cycle, an ultrasound was performed to detect the presence of the corpus luteum (CL). On day eleven, the SOV treatment was started with applications of porcine follicle-stimulating hormone (FSHP; Pluset®, Calier, Spain).

The total doses of FSHp for superovulation in the case of dairy cows in both synchronization protocols (DIV+Progesterone and Conventional) was 850 IU and, for

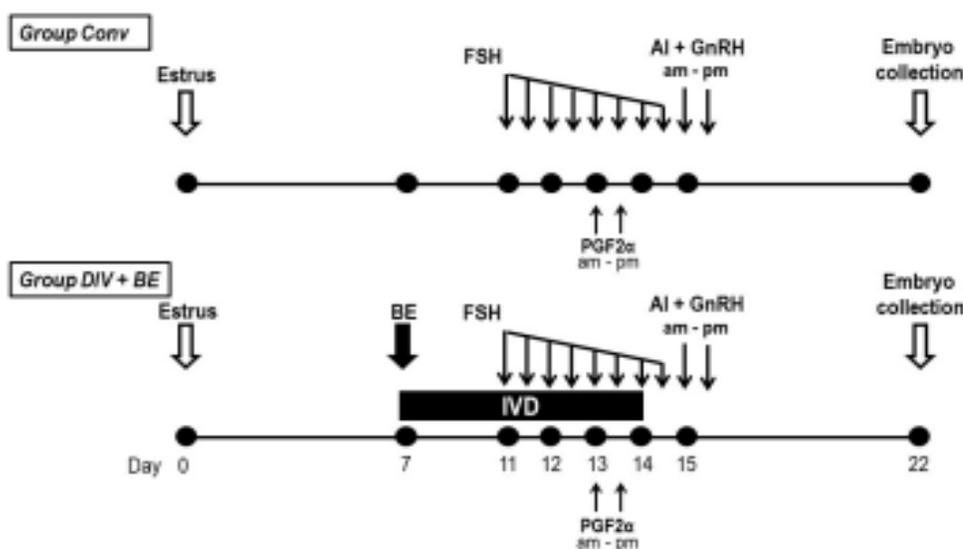


Fig. 1. Schematic description of the synchronization and SOV protocols. Conventional Group and group Estradiol Benzoate (EB) plus progesterone. The doses of pFSH used in dairy cattle were 175 IU, 175 IU, 125 IU, 125 IU, 75 IU, 75 IU, 50 IU, and 50 IU morning and evening. While in beef cattle it was 100 IU, 100 IU, 75 IU, 75 IU, 50 IU, 50 IU, 25 IU, and 25 IU of pFSH morning and afternoon. Artificial Insemination (AI), Follicle Stimulating Hormone (FSH), Progesterone (P4), intra-vaginal device (IVD), embryo transfer (ET).

beef cows, it was 500 IU of FSHP IM twice a day. (6:00 AM and 6:00 PM) in decreasing doses for four days as shown in Fig. 1. Seven days after AI, the embryos were collected with the non-surgical method (transcervical) described by Roberson (2015).

Embryo collection and evaluation: All the materials used for the collection of the embryos were sterile. The donor cow was placed in a chute, the base of the tail and the vulva were shaved and washed, and 5 mL of epidural anesthesia (2% lidocaine) was applied to immobilize the animal's tail and prevent rectal contractions. Rectal palpation was then performed to determine the number of *corpora lutea*, verifying this count by transrectal ultrasound. Subsequently, the hand was introduced through the rectum to manipulate the cervix and the uterine horns, then a mandrel covered with an 18-gauge Foley catheter was introduced vaginally, the cervix was crossed, and the anterior end of the catheter was directed towards the ipsilateral horn of the ovary that presented a greater number of *corpora lutea*, locating the anterior end 5 cm cranially from the bifurcation of the uterine horns. The catheter balloon was inflated according to the size of the uterine horn. Once the Foley catheter was inside, the mandrel was removed and connected to a "Y" circuit to introduce and extract the wash medium and drag with Hartman solution at 37.5°C (approximately 1000 mL per uterine horn). This same procedure was performed on the other uterine horn.

After recovering the washing medium containing the embryos, they were isolated from the total volume by filtration (Em-Com Filter). With a phase contrast stereoscopic microscope (MARK) the embryos were evaluated to classify them according to their quality based on their morphology (Bo *et al.* 2018). A maintenance holding medium was used and they were subsequently classified according to their stage of development. The characteristics that were observed were: compaction of the cells, regularity in the shape of the embryo, variation in the size of the cells, color and texture of the cytoplasm, presence of vesicles, extruded cells, diameter and regularity of the zona pellucida. The classification used was that proposed by Bó *et al.* (2018). The variables that were evaluated in this study were the superovulation response based on the number of follicles, the superovulation response was also considered based on the number of corpora lutea, quantity, quality, and viable embryos defined as those embryos compact and spherical with blastomeres of similar size with a homogenous color, texture and homogeneous cytoplasm (Bó *et al.* 2018).

Statistical analysis: The number of total follicles, total corpora lutea, and total embryos were analyzed using the PROC GLM option of SAS (Statistical Analysis Systems Inc., Cary, North Carolina, USA). The number of viable (transferable) embryos and degenerated embryos was also compared with the SAS GLM procedure, before a normality analysis of these data with the SAS UNIVARIATE option; data that were not normally distributed (Shapiro-Wilks test) were transformed with Log10X. Differences between means were considered statistically significant if $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The effect of the synchronization protocols prior to superovulation on the production of follicles, corpora lutea, and collected embryos is shown in Table 1. The two protocols were effective in stimulating the emergence of a new follicular wave. Significant statistical difference in the variables of the number of follicles and number of embryos in favour of the conventional treatment in the group of Beef cows ($P < 0.05$) was found. On the other hand, in the group of Dairy cows, only a statistical difference was found in the variable of the number of corpora lutea in favour of the conventional treatment ($P < 0.05$).

These results agree with the observations of Son *et al.* (2007) who showed that cows treated with an intravaginal progesterone device plus EB administration prior to superovulation resulted in response and embryo production comparable to that seen with conventional superovulation. It has been suggested that treatment with progesterone plus estradiol prior to superovulation synchronizes the appearance of follicular waves in cows and reduces the variability associated with superovulation treatments initiated at random stages of the follicular wave development (Mapletoft *et al.* 2002, Barrett *et al.* 2007). In this sense, some studies mention that treatment with 2.5 mg EB at the time of CIDR insertion results in the synchronized emergence of a new follicular wave 3-4 days later (Caccia and Bó 1998). It is important to point out that although it is mentioned that cows treated with progesterone through an intravaginal device, plus the administration of estrogen esters before superovulation treatment, at any stage of the estrous cycle, effectively synchronizes the emergence of the follicular wave, the development follicle and subsequent ovulation (Mapletoft *et al.* 1991, Andrade 2003), in the present study an increase in the number of follicles was observed after conventional treatment compared to treatment with IVD+EB in the group of the Angus breed ($P = 0.02$) not so in the Holstein breed group

Table 1. Superovulation response (Mean±SEM) of Beef and Milk cows subjected to two follicular emergence synchronization protocols: CONV and IVD+EB.

Variable	Beef cows		P value	Dairy cows		P value
	CONV	IVD+EB		CONV	IVD+EB	
Follicles (n)	13±2.7*	7.5±0.9 ^b	0.02	7.7±1.1	8±0.9	0.86
Corpus luteum (n)	12.2±0.9	10.4±0.7	0.11	8.7±0.6 ^a	6.3±0.6 ^b	0.01
Embryos (n)	11.7±2.1*	6.1±1.0 ^b	0.01	4.7±0.5	4.0±1.4	0.67

Table 2. Viable embryo (Mean±SEM) of Beef and Dairy cows subjected to two follicular emergence synchronization protocols: CONV and IVD+EB.

Variable	Beef cows		P value	Dairy cows		P value
	CONV	DIV+BE		CONV	DIV+BE	
Viable embryos	3.5±1.1	4.7±0.8	0.38	2.5±1.1	1±0.8	0.06

CONV, Conventional; IVD, Intravaginal device; EB, Estradiol benzoate.

($P=0.86$), however, in this breed the number of corpora lutea were higher when IVD+EB was not administered ($P=0.01$), although there was no difference in Beef cattle ($P=0.7$), these results contrast with what was reported by Bo *et al.* (1995), Broadbent *et al.* (1995) and Bo *et al.* (1996) in *Bos taurus* cows, where it has been proposed that the use of a IVD plus EB improves the superovulation response.

Table 2 shows the number of viable embryos of Beef and Dairy cows subjected to two follicular emergence synchronization protocols. In the group of Beef cows, the number of embryos was higher for the conventional protocol ($P<0.05$), but in Dairy cows there was no statistical difference in the number of viable embryos for conventional protocol ($P>0.05$). The results of this study in the two breeds contrast with the observations of Nasser *et al.* (2011) who observed that embryo quality was compromised by the absence of exogenous progesterone during FSH treatments. In the same sense, Wiley *et al.* (2019) also showed that the removal of endogenous progesterone during superovulation can decrease the total number of embryos.

Regarding the results of the production of viable embryos, it was not affected by the synchronization protocols in the group of Beef cows ($P>0.05$) but in Dairy cows, there was a tendency ($P=0.06$) to favour the conventional protocol (Table 2). These results are consistent with the data from Andrade *et al.* (2003), who found that the number of total ova, transferable embryos, degenerated embryos, and unfertilized ova were the same when follicular wave emergence was synchronized with 2 mg EB in CIDR-treated cows as for a conventional protocol. Our results are also consistent with the reports of Mitchell *et al.* (1998), in which total ovules and transferable embryos did not differ between treatments, using 2.5 mg of EB, and without EB to synchronize the follicular wave in cows treated with the use of CIDR. Another study reported that transferable embryos, degenerated embryos, and unfertilized ova did not differ when follicular wave emergence was synchronized with 2.5 mg EB in CIDR-treated cows than when a conventional protocol was used (Meyer *et al.* 2000).

The fact that in this study no statistical difference was found in favour of the use of DIV+BE in both synchronization treatments, coincides with Wiley *et al.* (2019) who reported an increase in the percentage of grade 1 embryos in a conventional protocol in beef-producing cows, which suggests that the conventional protocol does not affect embryo quality and that starting superovulation on day 11 of the estrous cycle with the presence of corpus

luteum and its production of progesterone is sufficient for a favourable response to superovulation and embryo production. This study is one of the few that exist where it is shown that the use of exogenous progesterone or estradiol esters is not necessary, even though there is literature where it is mentioned that the combination of progesterone plus estradiol in superovulation protocols not only impacts at the level of the superovulation response but also tend to improve embryonic quality (Bó and Mappletoft 2014). However, in the present study, the viability of the embryos produced from cows to which estradiol and exogenous progesterone were applied was not different compared to the cows to which it was not applied.

Taken together, these results suggest that pre-superovulation synchronization protocols using estrogen ester-induced follicular wave emergence synchronization in progesterone/estradiol-treated cows are not necessary as they give the same result as the conventional protocol (mid-luteal phase), the latter has the advantage of using fewer hormones, in addition to not requiring the use of steroids, which affect the food chain (Lane *et al.* 2008.), which allows dispensing with the use of these hormones that can present a risk in residues and also make superovulation treatments more expensive.

Administration of intravaginal devices impregnated with progesterone plus estradiol benzoate is not necessary for superstimulation of the emergence of a new follicular wave prior to SOV when initiated in the mid-luteal phase of the estrous cycle in Holstein and beef cattle. Similar results were found without significant differences between both treatments. These results are very helpful as an alternative to SOV protocols in countries where the use of steroidal hormones is prohibited.

REFERENCES

- AETA, 2017. 2015. Report and amp; Export Chart. http://www.aeta.org/docs/2015_Stats.pdf
- Alkan H, Karasahin T, Dursun S, Satilmis F, Erdem H and Guler M. 2020. Evaluation of the factors that affect the pregnancy rates during embryo transfer in beef heifers. *Reproduction in Domestic Animals* 55: 421–28.
- Andrade J C, Oliveira M A, Lima P F, Guido S I, Bartolomeu C C, Tenório Filho F, Pina V M, Iunes-Souza T C, Paula N R and Freitas J C. 2003. The use of steroid hormones in superovulation of Nelore donors at different stages of estrous cycle. *Animal Reproduction Science* 77: 117–25.
- Baracaldo M I, Martinez M F, Adams G P and Mappletoft R J. 2000. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 53(6): 1239–50.
- Barrett D M W, Duggavathi R, Davies K L, Bartlewski P M, Bagu E T and Rawlings N C. 2007. Differential effects of

- various oestradiol-17 β treatments on follicle-stimulating hormone peaks, luteinizing hormone pulses, basal gonadotropin concentrations, and antral follicle development in cyclic ewes. *Biology of Reproduction* **77**: 252–62.
- Baruselli P, Sá Filho M, Martins C, Nasser L, Nogueira M and Barros C. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* **65**: 77–88.
- Betteridge K J. 2003. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Science* **79**: 203e44.
- Bo G A, Adams J P, Pierson R A and Mapletoft R J. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* **43**(1): 31–40.
- Bo G A, Baruselli P S, Chesta P M and Martins C M. 2006. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* **65**(1): 89–101.
- Bo G A, Baruselli P S, Moreno D, Cutaia L, Caccia M and Tribulo R. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* **57**: 53–72.
- Caccia M and Bó G A. 1998. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* **1**(49): 341.
- Hirayama H, Naito A, Fujii T, Sugimoto M, Takedomi T, Moriyasu S, Sakai H and Kageyama S. 2019. Effects of genetic background on response to superovulation in Japanese Black cattle. *Journal of Veterinary Medical Science* <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0537>
- Jaton C, Koeck A, Sargolzaei M, Malchiodi F, Price C A, Schenkel F S and Miglior F. 2016. Genetic analysis of superovulatory response of Holstein cows in Canada. *Journal of Dairy Science* **99**: 3612–23.
- Kim U H, Suh G H, Nam H W, Kang H G and Kim I H. 2005. Follicular wave emergence, luteal function and synchrony of ovulation following GnRH or estradiol benzoate in a CIDR-treated, lactating Holstein cows. *Theriogenology* **63**(1): 260–68.
- Lane E A, Austin E J and Crowe M A. 2008. Oestrous synchronisation in cattle—Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. *Animal Reproduction Science* **109**(1–4): 1–16.
- Mapletoft R J, Steward K B and Adams G P. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development* **42**: 601–11.
- Mapletoft R and Bó G. 2012. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* **24**: 278–83.
- Mapletoft R J, Bo G and Murphy B D. 1991. The effect of biological activity of gonadotrophins on superovulation in the cow. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **15**: 74–92.
- Meyer J A, Wideman Jr D, Looney C R, Long C R and Bo G A. 2000. Embryo production rates of cattle superovulated with and without the presence of an intravaginal progesterone releasing device. *Theriogenology* **53**: 504 (Abstract).
- Mikkola M, Mäntysaari P, Tammiranta N., Peippo J., Taponen J. 2005. Effect of dietary protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers. *Animal Reproduction Science* **87**: 193–202.
- Mitchell B R, Martinez M, Bentley D M and Mapletoft R J. 1998. A comparison of estradiol 17 β and GnRH in synchronizing follicle wave emergence on superovulatory response in Holstein cows. *Theriogenology* **49**: 380.
- Nasser L F, Sá Filho M F, Reis E L, Rezende C R, Mapletoft R J, Bó G A and Baruselli P S. 2011. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* **76**: 320–27.
- Siddiqui M A, Shamsuddin M, Bhuiyan M M, Akbar M A and Kamaruddin K M. 2002. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. *Reproduction in Domestic Animals* **37**: 37–41.
- Son D S, Choe C Y, Choi S H, Rae-Cho S, Kim H J, Han M H, Ryu I S, Suh G H, Kim U H and Kim I H. 2007. Effect of estradiol benzoate or GnRH treatment prior to superstimulation in CIDR-treated, Korean native cows (*Bos taurus*). *Animal Reproduction Science* **100**: 14–21.
- Soria Parra M E, Soria Parra C A, Argudo Garzón D, Serpa García G, Méndez Álvarez S, Torres Inga Ca and Guevara Viera G E. 2017. Superovulación con sincronización de la onda folicular y con celo natural en vacas Holstein. *Revista de Producción Animal* **29**(1): 40–43.
- Velazquez M A. 2011. The role of nutritional supplementation on the outcome of superovulation in cattle. *Animal Reproduction Science* **126**: 1–10.
- Wiley C, Jahnke M, Redifer C, Gunn P J and Dohlman T. 2019. Effects of endogenous progesterone during ovarian follicle superstimulation on embryo quality and quantity in beef cows. *Theriogenology* **129**: 54–60.

ESTUDIO 2

ARTICULO 1: Competencia de los ovocitos obtenidos de vacas Holstein altas productoras sanas o con mastitis clínica para la producción in vitro de embriones

Efecto de la mastitis clínica sobre la competencia ovocitaria en la producción de embriones *in vitro* obtenidos de vacas Holstein.

M. A. González Ramos¹; H.Z. Guerrero Gallego¹; O Angel-García¹; F.G. Veliz Deras¹; R. Pedroso Sosa; J.L. Morales Cruz^{1*}. 1. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro UL, Torreón, Coahuila, México C.P. 27002. 2. Universidad Técnica de Manabí, Ecuador.

e-mail: moralesnarrojl@gmail.com

Resumen.

Este experimento tuvo como objetivo evaluar la competencia de los ovocitos para la producción *in vitro* de embriones obtenidos por la técnica de ovum pick-up en vacas Holstein altas productoras sanas o con mastitis clínica. Se recolectaron ovocitos de 36 vacas Holstein clasificadas en dos grupos: Grupo I (n=18; vacas sanas, 226 ovocitos) y Grupo II (n=18; vacas con mastitis clínica, 165 ovocitos), del total de ovocitos se obtuvo una tasa de ovocitos maduros del Grupo I de 91 % (205/226) y del Grupo II de 92% (152/165). No existió diferencia significativa, en cuanto a la tasa de clivaje de ovocitos (Grupo I= 44 vs Grupo II=50), tampoco existió diferencia estadística significativa en la tasa de blastocistos (Grupo I=14% vs Grupo II=20%) ni en la viabilidad de blastocistos (Grupo I=14 vs Grupo II=20). Sin embargo, el total de embriones obtenidos por grupo fue menor en el Grupo I (13 vs Grupo II=15), de la misma manera el promedio de embriones por vaca fue menor en el Grupo I (0.72 vs Grupo II= 0.83). Por otro lado, la tasa de embriones viables en el Grupo I fue mayor en comparación con el Grupo II (77 vs 60). Por esta razón nosotros hipotetizamos que la mastitis clínica afectara la competencia ovocitaria en la producción de embriones *in vitro* de vacas Holstein. En base a los resultados se concluye que la inflamación por mastitis no afecta la producción de embriones en ganado Holstein cuando son producidos *in vitro*, sin embargo, si afecta en la producción de embriones viables.

Palabra claves: biotecnologías. bovinos, PIV, transferencia de embriones, mastitis

Introducción.

La producción de embriones *in vitro* es una biotecnología para el mejoramiento genético en el ganado bovino. Sin embargo, estas biotecnologías reproductivas pueden verse afectadas por el estado de salud animal (Soto *et al.*, 2003 a). En efecto, diversos estudios han reportado que la mastitis clínica o subclínica afecta el comportamiento reproductivo y algunas de las funciones ováricas, caracterizada por la diferencia en la calidad ovocitaria obtenidos de vacas sanas y enfermas (Schrick *et al.*, 2001; Rahman, *et al.*, 2012; Kumar, *et al.*, 2017 a, Kumar, *et al.*, 2017 b). De acuerdo con diferentes estudios, existen evidencias que la mastitis genera la síntesis y secreción de moléculas mediadoras de la inflamación como las citoquinas y que son estas las que afectan los procesos reproductivos en el ganado bovino (Soto *et al.*, 2003a) y bufalino (Mansour *et al.*, 2016), se reconocen principalmente a la prostaglandina F₂ α , las interleucinas, el factor de necrosis tumoral y el óxido nítrico entre otras (Soto *et al.*, 2003b).

Por otra parte, las vacas que presentan mastitis tienden a disminuir su calidad ovocitaria cuando son utilizados en la producción de embriones *in vitro* (Hansen *et al.*, 2004; Das, 2016; Roth y Wolfenson, 2016). Sin embargo, el proceso de producción de embriones *in vitro* (PIV) con protocolos actuales que incluyen el uso de medios específicos para cada proceso, sacando a las células del fluido folicular se podría mejorar el desarrollo de los ovocitos a embriones. Por otra parte, se ha reportado que la mastitis inducida afecta la competencia de los ovocitos para desarrollarse a blastocistos (Roth *et al.*, 2013; Asaf *et al.*, 2014). Sin embargo, no existen trabajos hechos en ovocitos obtenidos por punción intrafolicular *in vivo* (Ovum Pick-Up) en vacas con mastitis clínica adquirida de forma natural. En este sentido, nosotros nos planteamos la siguiente hipótesis, que la mastitis clínica afectara la competencia ovocitaria en la producción de embriones *in vitro* de vacas Holstein. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la competencia ovocitaria para la producción de embriones *in vitro* obtenidos de vacas Holstein con mastitis clínica

Materiales y Métodos

Localización y condiciones climáticas del área de estudio

El estudio se llevó a cabo en una explotación lechera de la Comarca Lagunera, (103° 13' 42'' LO y 25° 31' 41'' LN, 1,100 msnm). Esta región se caracteriza por presentar un clima cálido extremo; con temperaturas en verano que oscilan de 23 a 43 °C, y en invierno de 2 a 9 °C, con una precipitación anual de 240 mm y humedad relativa de 29 a 83 % (INIFAP, 2017).

Animales experimentales y grupos

Para este estudio fueron seleccionadas vacas de alto valor genético que no presentaron ningún trastorno reproductivo o metabólico para ser consideradas como donadoras de ovocitos. Se consideraron vacas de dos a tres lactancia con una producción promedio de 35 kg de leche y una condición corporal de 3.5 en una escala de 1 a 5 (Bernabucci *et al.* 2005). Además, se incluyó un conteo de células somáticas (CCS) el cual se realizó a partir de los 10 días en producción. Se consideraron vacas sanas, aquellas que tuvieron <200,000 CCS/mL y vacas enfermas aquellas que tuvieron >200,000 CCS/mL según Roth *et al.* (2013) y que tuvieron reporte de mastitis clínica al momento de ser puncionadas por el método de OPU para obtener los ovocitos. Las vacas fueron alimentadas con una ración totalmente mezclada que cubría sus requerimientos nutricionales para vacas con alta producción de leche, según las recomendaciones de la el NRC (2001), sales minerales y agua a libre acceso. Se recolectaron ovocitos de 36 vacas Holstein mediante la técnica OPU descrita por Solís *et al.* (2012), las cuales fueron divididas en dos grupos: Grupo I (n=18; ovocitos de vacas sanas) y Grupo II (n=18; ovocitos de vacas con mastitis clínica), y posteriormente se trasladaron al laboratorio para ser sometidos al proceso de maduración, fertilización y cultivo *In vitro*. Este se realizó bajo los estándares de en un laboratorio acreditado y con personal capacitado en el desarrollo de esta biotecnología. Se siguieron los protocolos y se utilizó el equipo y material del mismo laboratorio descrita por Paula-Lopes and Hansen (2002).

Variables evaluadas

Se determinó la tasa de ovocitos maduros, tasa de clivaje de los ovocitos, tasa de blastocistos y viabilidad de los blastocistos.

Análisis estadístico.

La tasa de ovocitos maduros, tasa de clivaje de los ovocitos, tasa de blastocistos y viabilidad de los blastocistos se analizaron por el paquete estadístico Infostat versión 2012. Cordoba Arg. Según diseño definido con anterioridad, en caso de encontrar diferencia estadística se utilizará la docima de Duncan (1955). Cada una de las variables medidas será sometida a la prueba de los supuestos teóricos del ANAVA. Los datos se analizarán con el paquete estadístico Infostat versión 2012. Cordoba Arg. Se consideró una diferencia estadística de $P \leq 0.05$

Resultados

Los resultados de la competencia ovocitaria de las vacas con mastitis clínica se puede observar en la Tabla 1. No se encontró diferencias estadísticas para los ovocitos maduros y ovocitos clivados ($P > 0.05$), encontrándose un 90% y un 42% general para ambos grupos, respectivamente. De la misma manera, el porcentaje total de blastocisto no mostro diferencia estadística ($P > 0.05$).

Tabla 1. Evaluación de la competencia ovocitaria para la maduración, fertilización, desarrollo y obtención de embriones *In vitro* de vacas Holstein sanas o con mastitis clínica.

Variables	Sanas (n=18)	Mastitis (n=18)	Significancia
Total de ovocitos	226	165	$P > 0.05$
Ovocitos madurados (%)	91 (205/226)	92 (152/165)	$P > 0.05$
Ovocitos clivados (%)	44 (90/205)	50 (76/152)	$P > 0.05$
Total de blastocistos (%)	14 (13/90)	20 (15/76)	$P > 0.05$

La viabilidad embrionaria posterior al proceso de PIVE en vacas sanas o con mastitis clínica, no tuvo diferencias significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Viabilidad de embriones obtenidos de vacas Holstein sanas y con mastitis clínica.

Variables	Sanas (n=18)	Mastitis (n=18)	Significancia
Total de embriones	13	15	$P>0.05$
Embriones x vaca	0.72	0.83	$P>0.05$
Embriones viables (%)	77 (10/13)	60 (9/15)	$P>0.05$

Discusión

Los resultados del presente estudio no mostraron diferencias estadísticas en el proceso de producción *in vitro* de embriones. Estos resultados son contrarios a los que se han reportados en otros estudios que demuestran que la mastitis clínica afecta algunas funciones ováricas. En efecto, las vacas con mastitis clínica generan moléculas mediadoras de la inflamación entre las que destacan las citoquinas, prostaglandinas, interleucinas entre otros (Soto *et al.*, 2003 b). Es probable que nuestros resultados encontrados difieran a los reportados por otros autores debido a que en este estudio se utilizaron vacas con mastitis adquirida de manera natural y no inducida.

Los hallazgos de esta investigación, difieren a los informes expuestos por Roth *et al.* (2013) y Santos y Ribeiro (2014) quienes afirman que en vacas con mastitis se perturba la competencia de los ovocitos para la producción *in vitro* de embriones y que la tasa de blastocitos obtenida es baja. Este efecto ha sido relacionado a la respuesta inflamatoria caracterizada por el incremento de la temperatura corporal y la síntesis y secreción de los mediadores moleculares y celulares de la inflamación, que inhiben el proceso de maduración y desarrollo del óvulo (Roth *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2016). Los datos aportados

demuestran que es factible producir embriones utilizando como fuente ovocitos vacas con mastitis clínica sin que merme significativamente la eficiencia de esta tecnología.

De acuerdo con los estudios de Soto *et al.* (2003b) y Scenna (2006), la respuesta inmunitaria a la acción de los microorganismos participantes en la mastitis se acompaña del aumento de la síntesis y secreción de citoquinas, PGF2 α y óxido nítrico por las células del endometrio, la glándula mamaria y las células del cúmulo en el folículo ovárico. Estos compuestos, liberados durante el proceso inflamatorio que sucede posterior a la infestación bacteriana asociada a la mastitis, disminuye significativamente el porcentaje de ovocitos madurados, fertilizados y desarrollados a blastocito, así como la competencia de estos para la crio-conservación *in vitro* (Roth *et al.*, 2013; Santos y Ribeiro, 2014) también pueden inducir la regresión del cuerpo lúteo y la pérdida de la preñez (Stakheeva y Plemyashov, 2007; Walusimbi y Pate, 2013). Se ha determinado que la fase más susceptible al efecto nocivo de la PGF2 α sobre el crecimiento y el desarrollo embrionario es la mórula (Scenna, 2006).

En otras investigaciones, Bromfield y Sheldon (2013) mostraron que, las células de la granulosa ante un proceso pre-inflamatorio ocasionado por las endotoxinas de la *Escherichia coli*, aumentaron la síntesis y acumulación de citoquinas IL-6, y quimoquinas IL8 en el licor folicular. Estas sustancias inhibieron en la célula del folículo primordial la expresión del gen Supresor Tumoral de la fosfatasa (PTEN) y su transcriptor (FOXO3), responsables del desarrollo ulterior de los folículos primordiales.

Posteriormente, Bromfield y Sheldon (2013) y Magata, *et al.* (2014) confirmaron que los ovocitos recolectado de vacas afectadas con mastitis inducida por gérmenes gram negativos mostraron una interrupción de la expansión de las células del complejo cúmulo-ovocito, de la meiosis y de la división en la vesícula germinal durante la fase de maduración *in vitro*. Además, los blastocistos obtenidos tuvieron un mayor número de células con apoptosis comparado con los blastocistos provenientes de vacas no afectadas por la enfermedad, sin

embargo, existe discrepancia con este aspecto con el estudio de Roth *et al.* (2015), quienes no encontraron diferencias en la presencia de células apoptóticas para vacas sanas comparadas con las vacas con mastitis ocasionada por gérmenes gram negativos, lo que demuestra que los mecanismos fisiopatológicos aún no están plenamente aclarados. En otro estudio, se observó alteraciones en la expresión de los genes COX2, POU5F1 y HSF1 materno, asociados a la respuesta anti-inflamatoria (Asaf *et al.*, 2014).

Roth *et al.* (2013) reportaron que el número de células somáticas en la leche de vacas afectadas de mastitis influye en la competencia para el desarrollo de ovocitos fertilizados y cultivados *in vitro*, independientemente del tipo de bacteria que se vincula al proceso inflamatorio, las vacas en las que se halló un número medio (311 000) o alto (813 000) de células somáticas por mililitro en la leche, después del proceso de PIV, mostraron un número menor de óvulos que completaron su desarrollo a blastocisto en comparación a las vacas que mostraron un número bajo estas células (148 000).

Otras transformaciones importantes lo constituyen el estrés oxidativo que se origina en respuesta al proceso infeccioso, caracterizado por un aumento notable de los nitratos y nitritos, la disminución del ácido ascórbico en el suero sanguíneo y la actividad de la enzima Mielo-peroxidasa, con capacidad de desintegración de las proteínas e inhibición de la expresión de algunos genes que participan en la maduración y diferenciación celular durante el desarrollo del ovocito, así como la inducción de la apoptosis celular (Bromfield y Sheldon, 2013; Asaf *et al.*, 2014). En este sentido, en algunos experimentos se ha evaluado el efecto de la adición de antioxidantes en la eficacia del proceso de obtención *in vitro* de embriones (Yang y Fortune, 2007), y pudiera ser posible que no exista diferencia en la eficiencia de la PIV en este estudio y su discrepancia con previos resultados mencionados anteriormente debido a que en los medios actuales de PIV de embriones se utilizan sustancias antioxidantes las cuales ejercen un efecto positivo en la maduración y fertilización de los ovocitos y el desarrollo posterior del embrión (Abd Ellah, 2013). Por consiguiente, es probable que los resultados

obtenidos sean producto de tres aspectos clave; primero; posiblemente a que todo el protocolo de PIV de este experimento se realizó con medios artificiales fuera de su micro medio de licor folicular que pudo permitir una adecuada competencia para ser utilizado en el procesos de PIVE, mientras que en los estudios anteriores se utilizó fluido folicular como medio de maduración (Roth *et al.*, 2015). Segundo; las sustancias antioxidantes que estos contienen que pudieran colaborar en la eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y mejorar la competencia celular (Abd Ellah, 2013) y, tercero, actualmente en los programas de producción de embriones *in vitro* se eliminan los ovocitos de mala calidad (grado 4) previo al proceso dentro del laboratorio por existir suficiente evidencia científica de que estos no son viables para la producción embrionaria (De Loss *et al.*, 1989). Estos aspectos deben ser objeto de investigaciones en estudios futuros.

Estos hallazgos experimentales en primer lugar muestran que puede ser posible producir embriones mediante la técnica de fertilización *in vitro* con ovocitos provenientes de vacas altas productoras enfermas de mastitis clínica y con riesgo de ser desechadas y destinadas al sacrificio por la baja tasa de recuperación que esta enfermedad tiene (Halasa *et al.*, 2007) y en segundo lugar, que los procesos inflamatorios fuera del tracto reproductor pueden afectar la fertilidad y eficiencia de las tecnologías de reproducción asistida (Santos y Ribeiro, 2014; Ribeiro *et al.*, 2016). Por consiguiente, sería necesario desarrollar estrategias para modificar el proceso de fertilización y cultivo *in vitro* de embriones, con el fin de lograr la expresión adecuada de muchos genes implicados en la maduración, fertilización, crecimiento y desarrollo del ovocito. En conclusión, en el presente experimento se demostró que la mastitis clínica no afectó la competencia de los ovocitos para su maduración, fertilización y desarrollo *in vitro* con el protocolo utilizado en vacas Holstein altas productoras en clima semidesértico.

Literatura citada:

- Abd Ellah, M.R. (2013). Role of free radicals and antioxidants in mastitis. *Journal of advanced veterinary Research*. 3: 1-7.
- Asaf, S., Leitner, G., Furman, O., Lavon, Y., Kalo, D., Wolfenson, D., & Roth, Z. (2014). Effects of *Escherichia coli*-and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. *Reproduction*, 147(1), 33-43.
- Bromfield, J.J., y Sheldon, I.M. (2013). Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. *Biology of reproduction*. 88 (4), 98.
- Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., y Saikia, J. (2016). Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary world*, 9 (3), 260-268.
- De Bien, J. (2017). The follicular micro-environment of the oocyte in metabolically compromised dairy cows. Impact assessment as basic for oocyte rescue. Thesis. PhD. Universiteit Antwerpen. Belgium. 2017.
- De Loos, F., Van Vliet, P., Maurik, V., Kruip, A.M. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*. 24: 197-204.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. (2012). Paquete estadístico InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL
- Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. (2007E). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Veterinary Quarterly* 29 (1) 18:31.
- Hansen P. J. (2014). In Vitro Production of Bovine Embryos. P. J. Hansen Laboratory. Dept. of Animal Sciences, University of Florida. Versión 11.18.2014

- Hansen, P., Soto, P., Natzke, R. (2004). Mastitis and fertility in cattle -possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J Reprod Immunol.* 51:294 –301.
- Kumar, N., Manimaran, A., Kumaresan, A., Jeyakumar, S., Sreela, L. (2017 a). Mastitis effects on reproductive performance in dairy cattle: a review. *Trop Anim Health Prod.* Published on line,2017.
- Kumar, N., Manimaran, A., Sivaram, M., Kumaresan, A., Jeyakumar, S., Sreela, L., Mooventhan, P., Rajendran, D. (2017 b). Influence of clinical mastitis and its treatment outcome on reproductive performance I crossbred cows: A retrospective study. *Veterinary World.* 10 (5): 485-492.
- Lavon, Y., Erza, E., Leither, G., Wolfeson, D. (2011). Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:4538-4545.
- Magata, F., Horiuchi, M., Miyamoto, A., y Shimizu, T. (2014). Lipopolysaccharide (LPS) inhibits steroid production in theca cells of bovine follicles in vitro: distinct effect of LPS on theca cell function in pre-and post-selection follicles. *The Journal of reproduction and development,* 60 (4), 280.
- Mansour, M. M., Hendawy, A. O., Zeitoun, M. M. (2016) Effect of mastitis on luteal function and pregnancy rates in buffaloes. *Theriogenology.* Article In Press XXX 1-6.
- Rahman, M.M., Mazzilli, M., Pennarossa, G., brevini, T.A., Zecconi, A., Gandolfi, F. (2012). Chronic mastitis is associated with altered ovarian follicle development in dairy cattle. *J. Dairy Sci,* 95: 1885 -1893.
- Ribeiro, E.S., Gomes, G., Greco, L., Cerri, R.L., Vieira, N.A., Monteiro, P.L. Jr., Lima, F.S., Bisinoto, R.S., Thatcher, W., y Santos, J. E. P. (2016). Carryover effect of postpartum inflammatory disease on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. *Journal of dairy science.* 99 (3), 2201-2220.

- Roth, Z. (2015). Physiology and endocrinology symposium: Cellular and molecular mechanisms of heat stress related to bovine ovarian function. *Journal of animal science*. 93 (5), 2034-2044. doi:10.2527/jas2014-8625.
- Roth, Z., Dvriar, A., Kale, P, Lavon, Y., Krinfereks, Q., Wolfensen, D., Leintner, G. (2013). Naturally occurring mastitis disrupts development competence of bovine oocytes. *J. dairy Sci*. 96:6499'6505.
- Roth, Z., y Wolfenson, D. (2016). Comparing the effects of heat stress and mastitis on ovarian function in lactating cows: basic and applied aspects. 56; 5218-5227.
- Santos, J.E.P., y Ribeiro, E.S. (2014). Impact of animal health on reproduction of dairy cows. *Anim Reprod*. 11(3), 254-269.
- Scenna, F.N. (2006). "Inhibition of Direct Prostaglandin F2 α Effects on Pre-attachment Embryos Improves Reproductive Efficiency in Cattle". PhD diss., University of Tennessee.
- Schrick, F.N., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Lewis, M.J., Dowlen, H.H., y Oliver, S.P. (2001). Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci*. 84 (6), 1407-1412. *Sci*. 112:273–282.
- Soto, P., Natzke, R.P., Hansen, P.J. (2003 b). Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: Actions of Lipopolysaccharide, prostaglandin F2 α , and the Nitric Oxide generator, sodium nitroprosside dihydrate, on Oocyte maturation and embryonic development in cattle. *American Journal of Reproductive Immunology*. 50. 263-272.
- Soto, P., Natzke, R.P., y Hansen, P. J. (2003 a). Actions of Tumor Necrosis Factor- α on Oocyte Maturation and Embryonic Development in Cattle 1. *American Journal of Reproductive Immunology*. 50(5), 380-388.

Stakheeva, M., y Plemyashov, K. (2007). The Analysis of the effect of mastitis in breeding. *Mastitis symposium, Proceedings from a symposium*. St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine. Russia.

Walusimbi, S.S., y Pate, J.L. (2013). Role of immune cell in corpus luteum. Proceeding: Physiology and Endocrinology Symposium. Journal of animal science. 91(4), 1650-1659.

Yang, M.Y. y Fortune, J.E. (2007). Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicle in vitro. Mol Reprod. Dev. 7: 1095-1114.

Conclusión Generales

Estudio 1

En nuestro primer estudio concluimos que la administración de dispositivos intravaginales impregnados con progesterona más benzoato de estradiol no es necesaria para la superestimulación de la aparición de una nueva onda folicular antes de la SOV cuando se inicia en la fase lútea media del ciclo estral en ganado Holstein y de carne, encontrándose resultados similares sin diferencias significativas entre ambos tratamientos, siendo estos resultados muy útiles como alternativa a los protocolos SOV en países donde está prohibido el uso de hormonas esteroides.

Estudio 2

En este estudio demostramos que la mastitis clínica no afecta la competencia de los ovocitos para su maduración, fertilización y desarrollo *in vitro* con el protocolo utilizado en vacas Holstein altas productoras en clima semidesértico.