

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS**

**EFFECTO DEL TIPO DE HORMONA Y DOSIS SOBRE LA
RESPUESTA A LA SUPEROVULACIÓN DE HEMBRAS
BRAHMAN**

**HÉCTOR EMILIO PEREA LEZCANO
PE-12-171**

**DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ**

2011

**EFFECTO DEL TIPO DE HORMONA Y DOSIS SOBRE LA RESPUESTA A LA
SUPEROVULACIÓN DE HEMBRAS BRAHMAN**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS**

**PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL
DEBE SER OBTENIDO EN LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

APROBADO:

ING. PEDRO GUERRA M., M.Sc.

DIRECTOR

DR. REYNALDO DE ARMAS, Ph.D

ASESOR

ING. RODERICK GONZALEZ M., M.Sc.

ASESOR

**DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ**

2011

AGRADECIMIENTO

Primero que todo quiero agradecer a mi Dios todopoderoso por la vida y la salud, ya que sin su bendición y protección esto no hubiera sido posible.

Quiero extender mi agradecimiento a mis queridos padres Héctor Perea y Albenis Lezcano, quienes en todo instante estuvieron conmigo y me brindaron su amor y apoyo incondicional cuando más lo necesité. A mis hermanos, sobrino, abuelos y familia en general.

No podría dejar de agradecer también aquellos amigos que estuvieron conmigo y brindaron su apoyo de alguna u otra forma en los buenos y malos momentos, para todos ellos mi respeto y admiración.

A los miembros del comité de tesis, quienes con su apoyo y consejos contribuyeron en mi formación profesional.

Agradecimientos al Ing. Roderick González por su orientación y consejos durante la realización de este trabajo.

A todos, muchísimas gracias, Dios los bendiga.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres Héctor y Albenis, a mis hermanos, a mi novia Yaris y a mi sobrino Emilio Eduardo. No existen las palabras para describir el amor que siento por ustedes. También dedico este trabajo a mi abuela Catalina Caballero viuda de Lezcano y a la memoria de mi abuelo Emiliano Lezcano (q.e.p.d), que con sus consejos y enseñanzas me formaron en la persona que hoy soy.

EFECTO DEL TIPO DE HORMONA Y DOSIS SOBRE LA RESPUESTA A LA SUPEROVULACIÓN DE HEMBRAS BRAHMAN

Perea L., H. E. 2011. Efecto del tipo de hormona y dosis sobre la respuesta a la superovulación de hembras Brahman. Tesis Ingeniero Agrónomo Zootecnista. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá. Chiriquí, Panamá. 93 p.

RESUMEN

La superovulación es una herramienta del mejoramiento genético animal que permite un mejor aprovechamiento de animales de alto valor genético como también disminuir el intervalo generacional. Con el objetivo de determinar el efecto del tipo de hormona y la dosis sobre la respuesta a la superovulación con Hormona Folículo Estimulante (FSH) y Suero de Yegua Preñada (PMSG) en hembras Brahman, se realizó un estudio en la Estación Experimental “Carlos M. Ortega” del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá., donde se emplearon solamente vacas multíparas de la raza Brahman con un peso promedio de 425 kilogramos y edades entre los 36 y 60 meses. Los tratamientos fueron dos tipos de hormonas estimulantes del crecimiento y desarrollo folicular, PMSG y FSH, las cuales se emplearon según dosificación alta [PMSG 2500 UI + HCG = T₁ y FSH 31.25 mg (10 cc) = T₂], dosis media [PMSG 2000 UI + HCG = T₃ y FSH 25 mg (7.5 cc) = T₄] y dosis baja [PMSG 1500 UI + HCG = T₅] y [FSH 18.8 mg (6.5 cc) = T₆]. Se evaluaron número de folículos, números de cuerpos lúteos, producción de embriones y calidad embrionaria. Los datos fueron dispuestos en un diseño completamente al azar con el nivel hormonal dentro del tipo de hormona. El tipo de hormona resultó significativo sobre el número de folículos no ovulados (P=0.0122), número de cuerpos lúteos (P=0.0206) y embriones producidos (P=0.0044). Se reportó efecto significativo para la dosis de hormona sobre el número de folículos no ovulados (P=0.0100) y embriones producidos (P=0.0067). Sin embargo, para el número de cuerpos luteos no se reportó diferencia entre las dosis de hormona (P=0.2778). Comparado con FSH (1.20), PMSG presentó el mayor número de folículos no ovulados (9.71), los que en su mayoría no fueron ovulados; de esta forma con FSH se obtuvo el mayor número de cuerpos lúteos (6.8) y la mayor cantidad de embriones con dosis media y alta de FSH (3.5 y 4.0, respectivamente). En conclusión, La hormona Folículo Estimulante (FSH) ofreció mejor respuesta al tratamiento superovulatorio que el Suero de Yegua Preñada (PMSG). El tipo de hormona afectó el número de cuerpos lúteos y el número de embriones recuperados.

PALABRAS CLAVES: Hormona, superovulación, FSH, PMSG, folículos, cuerpo lúteo, embrión.

EFFECT OF HORMONE TYPE AND DOSE ON RESPONSE TO SUPEROVULATION IN FEMALES BRAHMAN

ABSTRACT

Superovulation is a tool of animal breeding that makes better use of animals of high genetic value and also decrease the generation interval. In order to determine the effect of type and dosage of hormone on the response to superovulation with follicle stimulating hormone (FSH) and pregnant mare serum (PMSG) in Brahman females, a study was conducted at the Experimental Station "*Carlos M . Ortega* " of the Agricultural Research Institute of Panama. It was used only multiparous cows of the Brahman breed with an average weight of 425 kg and ages between 36 and 60 months. The treatments were two types of growth-promoting hormones and follicular development, PMSG and FSH, which were used as high-dose [PMSG + HCG 2500 IU FSH = T1 and 31.25 mg (10 cc) = T2], average dose [PMSG 2000 IU HCG + FSH = T3 and 25 mg (7.5 cc) = T4] and low dose [1500 IU PMSG + HCG = T5] and [FSH 18.8 mg (6.5 cc) = T6]. We evaluated the number of follicles, numbers of corpus luteum, embryo production and embryo quality. The data were arranged in a completely randomized design with hormonal level within the type of hormone. The type of hormone was significant on the number of ovulated follicles ($P = 0.0122$), number of corpus luteum ($P = 0.0206$) and embryos produced ($P = 0.0044$). Significant effect was reported for the dose of hormone on the number of ovulated follicles ($P = 0.0100$) and embryos produce ($P = 0.0067$). However, there was no differences between doses of hormone on the number of corpus luteum ($P = 0.2778$). Compared with FSH (1.20), PMSG had the highest number of follicles ovulated (9.71), which mostly were not ovulated, thus FSH obtained the largest number of corpus luteum (6.8) and embryos with medium and high dose of FSH (3.5 and 4.0, respectively). In conclusion, follicle stimulating hormone (FSH) gave better response to superovulatory treatment than pregnant mare serum (PMSG). The type of hormone affected the number of corpus luteum and the number of embryos recovered.

Keywords: Hormone, superovulation, FSH, PMSG, follicles, corpus luteum, embryos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	<i>Página</i>
PÁGINA DE TÍTULO	i
PÁGINA DE APROBACIÓN	ii
AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INDICE DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del Problema a Investigar.....	2
1.2. Antecedentes.....	3
1.3. Justificación.....	8
1.4. Objetivos.....	8
1.4.1. Objetivo General.....	8
1.4.2. Objetivos Específicos.....	8
1.5. Hipótesis.....	9
1.6. Alcances y Limitaciones del Estudio.....	10
2. REVISIÓN DE LITERATURA	11
2.1. Fisiología de la Reproducción.....	11
2.2. Fases Del Ciclo Estral.....	13
2.2.1. Fase Folicular o de Regresión Lútea (Proestro).....	13
2.2.2. Fase Periovulatoria (Estro y Metaestro).....	14
2.2.2. Fase Luteal (Diestro).....	15

2.3.	Dinámica Folicular.....	16
2.3.1.	Reclutamiento.....	16
2.3.2.	Selección.....	17
2.3.3.	Dominancia.....	18
2.4.	Papel de las Hormonas en el Crecimiento Folicular.....	18
2.5.	Fisiología Hormonal	21
2.5.1.	La Gonadoliberina (GnRH).....	21
2.5.2.	Hormona Folículo Estimulante (FSH).....	23
2.5.3.	Hormona Luteinizante (LH).....	23
2.5.3.1.	Modo de Acción.....	23
2.5.4.	Progesterona (P ₄).....	24
2.5.4.1.	Modo de Acción.....	25
2.5.5.	Prostaglandina (Pg2α).....	25
2.5.5.1.	Modo de Acción.....	26
2.5.6.	Gonadotrofina Sérica de Yegua Preñada (PMSG) o Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG).....	26
2.5.6.1.	Modo de Acción.....	27
2.5.7.	Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG).....	27
2.5.7.1.	Modo de Acción.....	29
2.6.	Estimulación Ovárica para la Ovulación Múltiple.....	29
2.7.	La Superovulación (SOV) u Ovulación Múltiple.....	31
2.8.	Factores que Intervienen en la Respuesta Superovulatoria.....	34
2.8.1.	Factores Externos que Afectan la Respuesta Superovulatoria.....	35
2.8.2.	Factores Fisiológicos que Afectan la Respuesta Superovulatoria.....	36
2.8.2.1.	Especie y Raza.....	37
2.8.2.2.	Edad y Estado de Lactancia.....	38
2.8.2.3.	Fertilidad de la Vaca.....	39
2.9.	Inducción de la Superovulación en la Donante.....	40
2.10.	Protocolos de Superovulación (SOV).....	42
2.10.1.	Superovulación con FSH.....	42
2.10.2.	Superovulación con PMSG.....	44

2.11. Respuesta a los tratamientos SOV.....	47
2.12. Sincronización de la Receptora.....	48
2.13. Sincronía Entre Receptora y Donadora.....	49
2.14. Preparación e Inseminación de la Donadora.....	51
2.15. Colecta de Embriones.....	53
2.16. Clasificación de los Embriones.....	54
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
3.1. Localización del Ensayo.....	59
3.2. Animales Experimentales.....	59
3.3. Manejo de los Animales.....	60
3.4. Manejo Sanitario.....	61
3.5. Tratamientos.....	61
3.6. Metodología... ..	42
3.6.1. Protocolo de Superovulación Utilizando la Hormona FSH.....	63
3.6.2. Protocolo de Superovulación Utilizando la Hormona PMSG...	64
3.7. Diagnósticos	65
3.8. Lavado de Donadoras.....	65
3.9. Búsqueda y Clasificación de Embriones.....	65
3.9.1. Los Tranferibles.....	66
3.9.2. Los no Tranferibles.....	66
3.10. Variables de Respuesta.....	67
3.11. Análisis Estadístico.....	68
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
4.1. Número de Folículos no Ovulados por Hormona y por Dosis	69
4.2. Número de Cuerpos Lúteos por Tratamiento.....	74
4.3. Producción de Embriones por Tratamientos.....	78
4.4. Estadios y Calidad Embrionaria por Tratamiento.....	81
5. CONCLUSIONES.....	82

6. RECOMENDACIONES.....	83
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

ÍNDICE DE CUADROS

	TÍTULO	PÁGINA
CUADRO I.	NUMERO DE ESTRUCTURAS RECUPERADAS Y CALIDAD DE LOS EMBRIONES EN PROGRAMAS SOV. (1980-1986) (ADAPTADO DE HASLER <i>ET AL.</i> 1983).....	35
CUADRO II.	EFECTO DE LA CALIDAD SEMINAL SOBRE LA TASA DE FERTILIZACION DE EMBRIONES RECUPERADOS (ADAPTADO DE CHENOWETH 2007).....	36
CUADRO III.	EFECTO DEL MOMENTO DE LA INSEMINACION SOBRE LA TASA DE FERTILIZACION DE VACAS SOV. (ADAPTADO DE DALTON <i>ET AL.</i> , 2000).....	36
CUADRO IV.	COMPARACION DE LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA CON FSH EN VACAS BRAHMAN Y HOSTEIN (GUZMÁN, 2002).	37
CUADRO V.	EFECTO DE LA EDAD SOBRE EL NUMERO DE EMBRIONES PRODUCIDOS (HASLER, 1983).....	38
CUADRO VI.	NUMERO DE EMBRIONES Y OVOCITOS RECUPERADOS SIN FERTILIZAR, EMBRIONES DEGENERADOS, EMBRIONES TRANSFERIBLES Y NUMERO DE EMBRIONES POR LAVADO DE ACUERDO A LA ETAPA DE DESARROLLO Y CALIDAD PARA LAS DONANTES LACTANTES Y NO LACTANTES (LSD±S.E) (ADAPTADO DE GUZMÁN, 2002).....	39
CUADRO VII.	COMPARACION DE LAS TASAS DE PRODUCCION DE EMBRIONES DE VACAS FERTILIES O INFERTILES (HASLER, ET.AL., 1983).....	40
CUADRO VIII.	RESPUESTA SOV A LA APLICACIÓN DE UNA SOLA INYECCION SUBCUTANEA FRENTE A DOS VECES AL DIA INTRAMUSCULAR DE FSH (FOLLTROPIN-V. 400MG) 8 DIAS DESPUES DE LA OVULACION EN EL GRUPO CONTROL O 5 DIAS DESPUES DE PUESTO EL IMPLANTE AURICULAR (ADAPTADO DE BÓ, 1996).....	42

CUADRO IX.	CLASIFICACION DE LOS EMBRIONES DE ACUERDO AL ESTADO.....	58
CUADRO X.	DISTRIBUCION DE LOS TRATAMIENTOS.....	62
CUADRO XI.	ANOVA PARA NÚMERO DE FOLICULOS NO OVULADOS POR DOSIS.....	69
CUADRO XII.	ANOVA PARA NÚMERO DE CUERPOS LUTEOS POR TRATAMIENTO.....	75
CUADRO XIII.	ANOVA PARA PRODUCCION DE EMBRIONES POR TRATAMIENTO.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
FIGURA 1. SECRECIONES HORMONALES QUE TIENE LUGAR DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA HEMBRA BOVINA.....	11
FIGURA 2. PROCESO DE FOLICULOGÉNESIS.....	12
FIGURA 3. REPRESENTACION DE LA DINAMICA FOLICULAR.....	20
FIGURA 4. ESQUEMA DE APLICACIÓN DE FSH EN PROTOCOLOS DE SOV. (Adaptado de Bernal, 2007).....	44
FIGURA 5. ESQUEMA DE APLICACIÓN EN PROTOCOLOS DE SOV UTILIZANDO PMSG. (Adaptado de Bernal, 2007).....	45
FIGURA 6. RESPUESTA DE LOS OVARIOS A TRATAMIENTO SOV (Foto: Bernal, 2007).....	48
FIGURA 7. SINCRONIZACION DE RECEPTORAS UTILIZANDO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL BOVINO (DIB) (Foto: A. Bernal, 2007).....	50
FIGURA 8. SINCRONIZACION DE RECEPTORAS UTILIZANDO DISPOSITIVO AURICULAR (Foto: A. Bernal, 2007).....	51
FIGURA 9. ESQUEMA DE SUPEROVULACIÓN CON IMPLANTE (CIDR®, CRESTAR®) CON CELO DE REFERENCIA (INDUCIDO) UTILIZADO EN LA EMPRESA GRI. (Fuente: Orellana y Peralta, 2007).....	52
FIGURA 10. ESQUEMA DE SUPEROVULACIÓN (SOV) UTILIZANDO PGF2A. (Fuente: Orellana y Peralta, 2007)	53
FIGURA 11. EMBRION GRADO 1 APTO PARA SER TRANSFERIDO A UNA RECEPTORA. (Foto: De León, 2008).....	56

FIGURA 12.	EMBRION CON RUPTURA DE LA ZONA PELUCIDA, PERO APTO PARA SER TRANFERIDO (Foto: De León, 2008).....	57
FIGURA 13.	DESARROLLO EMBRIONARIO. (Fuente: Córdoba, 1996).....	57
FIGURA 14.	VACA BRAHMAN ELITE DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE GUALACA SELECCIONADA COMO DONADORA.....	60
FIGURA 15.	PRESENTACION COMERCIAL DE LA FSH.....	64
FIGURA 16.	PRESENTACION COMERCIAL DE LA PMSG.....	65
FIGURA 17.	MEDIA DE LOS FOLICULOS NO OVULADOS POR TIPO DE HORMONA.....	70
FIGURA 18.	NUMERO DE FOLICULOS NO OVULADOS POR DOSIS DE HORMONA.....	71
FIGURA 19.	FOLICULOS NO OVULADOS OBSERVADOS A TRAVÉS DEL ECOGRAFO.....	72
FIGURA 20.	NUMERO DE CUERPOS LUTEOS POR HORMONA.....	76
FIGURA 21.	NUMERO DE CUERPOS LUTEOS POR TRATAMIENTO HORMONAL.....	77
FIGURA 22.	NUMERO DE EMBRIONES POR DOSIS DE HORMONA...	79
FIGURA 23.	NUMERO DE EMBRIONES POR TIPO DE HORMONA.....	80

1. INTRODUCCIÓN

En Panamá se ha incrementado el uso de la técnica de superovulación y trasplantes de embriones, utilizando protocolos hormonales para promover la superovulación pero a un alto costo y con respuesta altamente variable según la categoría y la raza del animal.

Según **Mc Donald (1981)** se han estudiado diversos métodos encaminados a producir superovulación en animales domésticos, centrados generalmente en el empleo de hormonas folículo estimulantes y la fuente más práctica ha sido el uso de gonadotropinas como FSH (Hormona Folículo Estimulante) y PMSG (Gonadotropina Coriónica Equina).

Por lo tanto, es necesario encontrar y diseñar protocolos hormonales de súper ovulación que sean económicos y biológicamente viables, de forma tal que permita causar mayor impacto en los sistemas ganaderos bovinos a través de esta técnica biotecnológica como herramienta para el mejoramiento genético.

Los tratamientos para superovulación se utilizan en forma amplia en los programas de transferencia de embriones para incrementar la cantidad de estos animales considerados con un mérito genético superior (**Hafez, 1989**).

Los actuales conocimientos sobre la dinámica de las poblaciones foliculares en el ovario bovino ha obligado a un replanteamiento de las bases en los

métodos tradicionales de control de celos, mientras que simultáneamente abre las puertas a nuevos protocolos de inducción y sincronización no solamente de celos sino también de ovulación (**Fernández, 2003**).

Este trabajo está enfocado a buscar nuevos métodos y protocolos de superovulación que sean económicamente viables y presenten buenos resultados en cuanto a calidad, número y producción de embriones para optimizar el mejoramiento genético en nuestro país.

1.1. Planteamiento del Problema a Investigar

El sector pecuario constituye un campo primario de producción cuya tecnificación depende en gran medida el desarrollo de muchos países. Gracias al desarrollo científico en la última década, este sector ha logrado avances significativos en el campo de la biotecnología, que están generando cambios revolucionarios en los modos de producción y facilitando la satisfacción de necesidades de los productos demandados por una población creciente en una frontera agrícola cada día más estrecha.

El ineficiente aprovechamiento de los recursos genéticos provenientes de las hembras bovinas de alto potencial productivo es reconocido como una limitante importante en la propagación de sus genes.

Lo que se busca en este proyecto mediante la superovulación es tener la mayor cantidad de embriones transferibles por vaca, tomando en cuenta que

la FSH tiene un alto valor comercial, así como también buscar otras alternativas de hormonas como PMSG con Anti-PMSG o con HCG (Gonadotropina Coriónica Humana) para abaratar costos y conseguir la mayor cantidad de embriones transferibles (arriba de 5 embriones).

1.2. Antecedentes

La principal meta de todo programa de superovulación es la obtención de la mayor cantidad de embriones transferibles por donante a un bajo costo. En este sentido **De Armas (1992)** y **Bernal (2007)**, señalan que una de las estrategias más viables y económicas es la utilización de suero de yegua preñada (PMSG), a razón de 1000 – 1500 Unidades Internacionales (UI) en novillas y 1500 - 2500 UI en vacas, ya que es de fácil aplicación y con buena respuesta superovulatoria.

Sin embargo **Duch (1986)**, señala que existe un efecto negativo a la utilización de altas dosis de PMSG debido a su alta persistencia en sangre por lo cual indica que debe ser acompañada por un anti PMSG. Esta alta persistencia en sangre afecta negativamente la calidad embrionaria, debido a que continúa actuando sobre el ovario y provoca un nuevo reclutamiento folicular. Estos nuevos folículos en desarrollo producen una alta cantidad de estrógeno la cual afecta la calidad embrionaria.

Según **Mc Donald (1981)**, el uso repetido de PMSG produce una reacción secundaria, indeseable en el animal con base inmunológica, ya que PMSG es

una proteína extraña que provoca reacción antígeno-anticuerpo. Durante los ciclos estrales subsiguientes la respuesta ovárica a las inyecciones de PMSG es cada vez menor a medida que aumentan las concentraciones de anticuerpos. Por último, la respuesta es tan limitada que obliga a suspender el proceso. Además, con frecuencia se observan reacciones anafilactoides graves con síntomas generales.

Petr et al. (1990) mencionan que por tener una vida media larga, la PMSG puede provocar el desarrollo de folículos adicionales que no alcanzan a ovular; y por estar en una etapa de desarrollo avanzada, secretan niveles altos de estrógenos que pueden afectar a los embriones en sus primeras etapas de desarrollo, obteniendo así un número mínimo de embriones para ser transferidos.

Por otro lado resultados obtenidos en laboratorio han demostrado que con la inclusión del antisuero PMSG (anti-PMSG) aplicado intramuscular (IM) en coincidencia con la segunda inyección en dosis equivalentes a la neutralización de la mitad de la cantidad de PMSG suministrada para la estimulación ovárica, se logran mejorar los resultados superovulatorios. Así es posible incrementar en un embrión transferible el resultado promedio para el tratamiento con PMSG (**De Armas et al., 1996**).

Otra metodología empleada para la superovulación es la utilización de Hormona Folículo Estimulante (FSH), la cual según diversos autores produce

una alta cantidad de embriones y de buena calidad, sin embargo, por su corta duración en sangre, es necesario aplicarlas en intervalos de 12 horas para mantener concentraciones adecuadas de esta hormona en sangre.

Debido a su rápida degradación en el organismo resulta necesario su suministro en intervalos (12 horas) que garanticen los niveles de estimulación ovárica necesarios por un período de tiempo determinado (4 a 5 días). Para facilitar su aplicación recomendamos realizar una dilución de 1mg: 1ml (FSH: SSF) y tomar en jeringuillas desechables los volúmenes correspondientes a cada dosis a suministrar (8 ó 10 dosis en dependencia del esquema empleado) y conservarlas en refrigeración, sacando solamente en el momento del tratamiento la dosis a aplicar.

De Armas (1996) indica que altos niveles de progesterona son necesarios en el inicio de la superovulación (presencia de un CL activo). Con la aplicación de FSH purificada no se incrementan los niveles de progesterona como cuando se emplea PMSG, HCG u otros preparados hipofisiarios menos puros. Por otro lado **Bernal (2007)**, indica que uno de los inconvenientes de la utilización de FSH, radica en la constante manipulación de los animales, lo cual para algunas razas principalmente las cebuínas, resulta estresante y la respuesta variable a la superovulación. De igual forma sugiere que por el alto costo de esta hormona se debe buscar alternativas que resulten económicas y biológicamente viables.

Estudios realizados por **Lindsell et al. (1986)** y **Savio et al. (1988)**, demuestran que la respuesta a FSH es significativa cuando se tiene una contaminación mínima de ella. Sin embargo, en un estudio realizado por **Schmidt et al. (1988)**, mencionan que al tener una contaminación mínima de LH puede afectar las primeras etapas de los óvulos fertilizados dando como resultado que disminuya el número de embriones transferibles.

Según **De Armas et al. (1996)** la limitante de este método en nuestra área tropical es que la mayoría de las hembras donantes no son animales grasos y los resultados son algo variables. En sentido general la hormona FSH brinda resultados estables (4-8 embriones transferibles) y consistentes a pesar de su costo al ser comparada con la PMSG. Además es más eficiente en la superovulación de animales con sangre cebú en su pedigrí. No obstante la elección de una u otra hormona para la superovulación depende de la disponibilidad, precios, personal, condiciones de tenencia de las donantes, interés particular y otras consideraciones que están en manos del profesional que debe tomar la decisión.

Diferentes grupos han empleado tratamientos en animales aplicando dosis decrecientes de hormonas mientras otros recomiendan dosis iguales, en nuestra experiencia no hay diferencias entre los resultados de uno u otro proceder, por lo que para simplificar el trabajo recomendamos el empleo de dosis iguales durante el tratamiento.

De Armas y Solano (1996) indican que normalmente los embriones llegan al útero después del día cinco del ciclo, por lo que, es a partir de este momento que los mismo pueden ser recolectados por las técnicas no quirúrgicas disponibles en la actualidad. Es práctica habitual realizar la recolección el día siete, pues se asegura con ello que todos los embriones o huevos hayan arribado al útero. Por otra parte se ha demostrado que los estadios de desarrollo correspondientes a este día (mórulas compactas y blastocistos) brindan altos porcentajes de preñez a la transferencia tanto en fresco como congelados. Otro aspecto que avala la elección de este día es la integridad de la zona pelúcida la cual se rompe y comienza la eclosión embrionaria ya desde el día 8.5, evento que hace al embrión más proclive a las contaminaciones con gérmenes foráneos y lo convierte en intolerante de las bajas temperaturas.

Para mejorar los resultados de la recolección se han ideado diferentes equipos que permiten un adecuado acceso al cuerno uterino y eficientes niveles de recuperación del medio empleado en el lavado del útero. La eficiencia de los mismos, tiene más que ver con la habilidad y destreza del operador en su empleo que con las facilidades técnicas de cada equipo en particular. El principio de todos los equipos y sistemas consiste en acceder hasta el segundo tercio del cuerno uterino y colocar por delante de ella el balón inflable del catéter que cerrará la luz uterina para evitar que el líquido insuflado se pierda por los orificios del catéter para su recuperación.

1.3. Justificación

Los resultados obtenidos por diferentes autores indican variabilidad en la calidad de los embriones obtenidos por los dos métodos con ambas hormonas FSH y PMSG y el alto costo de la primera hormona.

En Panamá no se tiene reportado experiencia alguna utilizando la hormona PMSG y Anti-PMSG como alternativa a los métodos tradicionales de superovulación. Por lo tanto en este trabajo se ha propuesto realizar una ardua investigación la cual tiene como objetivo principal abaratar los costos de métodos de superovulación y la obtención de embriones de excelente calidad como herramienta de mejoramiento genético animal y así el mejor aprovechamiento de animales de alto valor genético, como también disminuir intervalos generacionales.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Determinar el efecto del tipo de hormona y dosis sobre la respuesta a superovulación en las hembras Brahman.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar el número de cuerpos lúteos en las hembras Brahman de acuerdo al tipo de hormona y su dosis.

- Evaluar la calidad embrionaria en las hembras Brahman de acuerdo al tipo de hormona y su dosis.

1.5. Hipótesis

Para objetivo 1

H₀: No hay efecto entre el tipo de hormona y sus dosis sobre el número de cuerpos lúteos de hembras Brahman.

H_a: Si hay efecto entre el tipo de hormona y sus dosis sobre el número de cuerpos lúteos de hembras Brahman.

Para objetivo 2

H₀: No hay efecto entre el tipo de hormona y sus dosis sobre la respuesta a la superovulación y calidad embrionaria de hembras Brahman.

H_a: Si hay efecto entre el tipo de hormona y sus dosis sobre la respuesta a la superovulación y calidad embrionaria de hembras Brahman.

1.6. Alcances y Limitaciones del Estudio

Alcances

- Facilitar la incorporación de innovaciones en los sistemas productivos que podrían aumentar significativamente la rentabilidad en la producción bovina.

- Se puede sostener que la utilización de la tecnología de superovulación para la producción de embriones es una alternativa económica para contribuir a los generar cambios productivos que requiere la ganadería en nuestro país.

Limitaciones

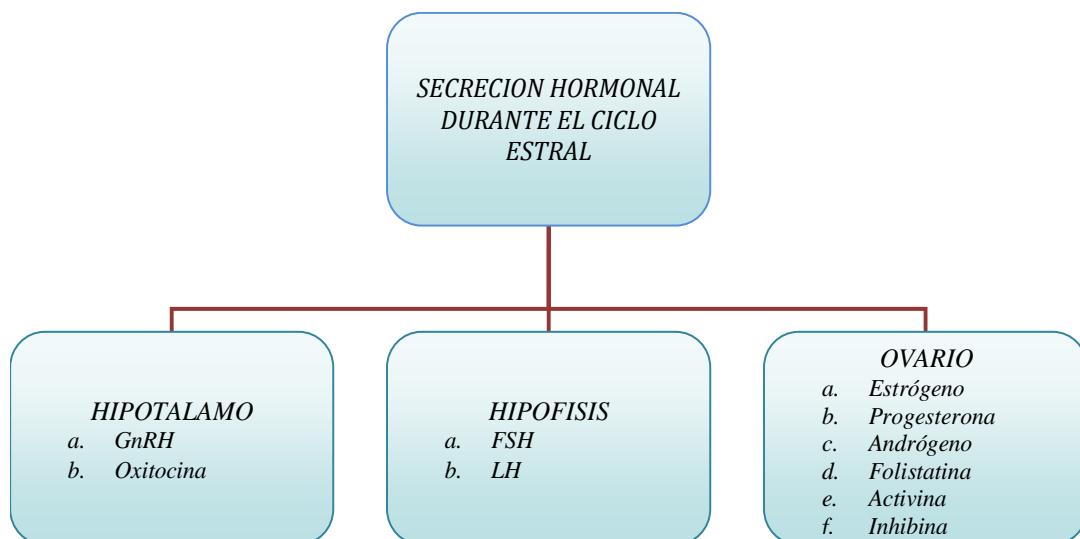
- ✗ Los métodos de recolección de embriones.
- ✗ Los altos costos de insumos.
- ✗ La variabilidad en la respuesta a los tratamientos de superovulación.
- ✗ Los factores relacionados con el uso de las gonadotropinas utilizadas.
- ✗ Los protocolos de superovulación utilizados.
- ✗ Los factores ligados al animal (Genética, individualidad y aspectos fisiológicos) y los efectos ambientales que causen estrés.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Fisiología de la Reproducción

La función reproductora en la hembra está circunscrita a ciclos reproductivos que están gobernados por el factores de liberación hipotalámico de gonadotrofinas (GnRH), las gonadotrofinas hipofisarias (Hormona folículo estimulante (FSH) y Hormona luteinizante (LH)) y las hormonas ováricas (estrógeno y progesterona (P_4)), siendo su actividad sexual mucho más compleja que en el macho (Figura 1).

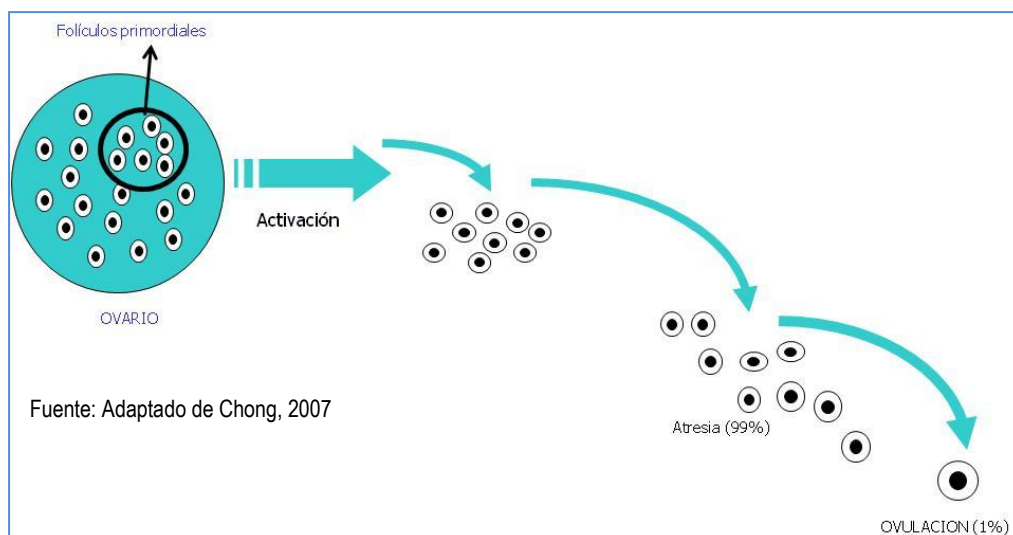
FIGURA 1. SECRECIONES HORMONALES QUE TIENE LUGAR DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA HEMBRA BOVINA.



Durante la vida reproductiva de la hembra bovina, se suceden una serie de cambios asociados a la ovulación, las modificaciones bioquímicas y fisiológicas del oviducto y el útero que proveen un medio adecuado para que tenga lugar la fertilización, el desarrollo embrionario, la implantación, la gestación y el reconocimiento materno del conceptus, el parto, la lactancia y el reinicio de la actividad ovárica (**Pérez, 2002**).

La foliculogénesis es un proceso dinámico caracterizado por una proliferación y diferenciación de las células somáticas que componen el folículo, estos se desarrollan en forma de ondas, cada onda folicular está compuesta por una corte de folículos que han dejado su estado de reposo y empiezan a crecer asociados a un aumento de la concentración de hormonas folículo estimulante (FSH), ver Figura 2. Entre ellos se establece una competencia por la dominancia y adquirir el desarrollo competitivo que le permita seguir creciendo en un ambiente donde los demás folículos sufren atresia (**Henao y Trujillo, 2000**).

FIGURA 2. PROCESO DE FOLICULOGÉNESIS.



2.2. Fases Del Ciclo Estral

El ciclo estral se puede dividir en tres fases:

- a. Fase folicular o de regresión lútea (proestro)
- b. Fase periovulatoria (estro y metaestro)
- c. Fase luteal (diestro).

El día cero del ciclo estral es el día del celo, signo visible a simple vista; sin embargo desde el punto de vista fisiológico, la descripción se realizará a partir de la destrucción del cuerpo lúteo y finalizará en la destrucción del cuerpo lúteo del próximo ciclo.

2.2.1. Fase Folicular o de Regresión Lútea (Proestro)

Este período, cuya duración es de tres días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y finaliza con la manifestación de celo. Al producirse la destrucción del cuerpo lúteo tenemos una caída en los niveles de progesterona y posteriormente una pérdida de tejido luteal, siendo la prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) de origen uterino el principal luteolítico en los animales domésticos y en la mayoría de los roedores.

Como consecuencia de la caída de los niveles de progesterona, disminuye el “*feed back*” negativo que dicha hormona tenía a nivel hipotalámico y comienzan a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas gonadotróficas (hormona folículo estimulante (FSH) y hormono luteinizante (LH) y se estimula el crecimiento folicular con el desarrollo de un gran folículo y el aumento en

los niveles de estradiol. Cuando los estrógenos alcanzan cierto nivel, se estimula la receptividad al macho y comienza el período de celo o estro.

2.2.2. Fase Periovulatoria (Estro y Metaestro).

Esta fase comienza con la receptividad al macho (se deja montar por vacas y toros), e involucra todos los cambios que permiten la ovulación y comienzo de la formación del cuerpo lúteo.

Durante el estro, cuya duración es de 18 ± 6 hs, la vaca manifiesta inquietud, ansiedad, brama con frecuencia y pierde el apetito; en el caso de las vacas lecheras, se reduce su producción. Las vacas presentan descarga de mucus con mínima viscosidad (filante), cuyo olor atrae y excita al toro (presencia de feromonas), edema de vulva y en el útero se produce un aumento del tono miometrial, detectado fácilmente por palpación transrectal.

En esta fase, los estrógenos en altas concentraciones alcanzan el umbral de estimulación del centro cíclico hipotalámico, estimulando a las neuronas hipotalámicas a producir el pico de GnRH y en consecuencia el pico de LH. Con respecto a la FSH, disminuye su secreción, consecuencia del feed back negativo estrogénico y de la inhibina, con excepción del momento en que se produce el pico pre-ovulatorio de LH, en que puede aparecer un pico de FSH. Posteriormente, cuatro a 12 horas después de la onda de LH, se incrementan la concentración basal y la amplitud de los pulsos de FSH, relacionándose esto con la primera onda de crecimiento folicular.

Luego de 12 a 24 horas de comenzado el celo, el sistema nervioso de la vaca se torna refractario al estradiol y cesan todas las manifestaciones psíquicas del mismo. El período inmediato a la finalización del celo, es el metaestro (seis días). En este período ocurre la ovulación de la vaca, a diferencia de las otras especies que lo hacen durante el celo, y comienza la organización celular y desarrollo del cuerpo lúteo. La ovulación ocurre 28 a 32 horas de iniciado el celo y es desencadenada por el pico preovulatorio de LH. A la ovulación sigue hemorragia profunda y el folículo se llena de sangre convirtiéndose en cuerpo hemorrágico.

En la formación del cuerpo lúteo (luteinización) se producen una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que permiten que las células foliculares se transformen en células luteales, cambios que finalizan al séptimo día con un cuerpo lúteo funcional.

2.2.3. Fase Luteal (Diestro)

Esta fase se caracteriza por el dominio del cuerpo lúteo. El mantenimiento del cuerpo lúteo, así como la síntesis de progesterona está ligada a la hormona LH que es progesterotrófica y luteotrófica. Otras hormonas que intervendrían en la síntesis de progesterona, son la FSH y la PGI₂. La FSH se uniría a receptores ubicados en el cuerpo lúteo y provocaría un aumento en la secreción de progesterona. En lo referente a la PGI₂ además de estimular a las células luteales para producir progesterona, aumentaría el flujo sanguíneo

a nivel ovárico con el efecto positivo que esto significa sobre la síntesis y secreción de progesterona. Si el huevo no es fecundado, el cuerpo lúteo permanece funcional hasta el día 15-20, después del cual comienza a regresionar en preparación para un nuevo ciclo estral.

2.3. Dinámica Folicular

Con el uso de la ecografía se ha podido confirmar el modelo teórico planteado por **Rajakoski (1960)** quien sostenía que los patrones de crecimiento y regresión folicular, tanto a nivel individual como en el total de la población, se desarrollan durante todo el ciclo, pero no de forma continua sino muy relacionada con el momento o día de ocurrencia.

El seguimiento ecográfico de los folículos durante todo el ciclo permite describir los niveles de crecimiento y desarrollo foliculares, de manera tal que el desarrollo folicular se puede enmarcar en las etapas de reclutamiento, selección y dominancia (**Savio et al., 1987; Savio et al. 1988; Sirois, 1988**).

2.3.1. Reclutamiento

El reclutamiento folicular es el proceso por el que, por efecto de la FSH, los folículos antrales pequeños (2-3 milímetros de diámetro) comienzan a crecer, iniciando una onda de desarrollo; grupos de folículos son reclutados y este proceso se relaciona, temporalmente, con cambios medibles de la FSH circulante (**Adams et al. 1992**).

Los folículos desarrollan la fase de desviación y llegan a la dominancia 4 días después de la fase de selección partiendo de una cohorte de +3 milímetros de diámetro con un crecimiento muy rápido (**Guinther et al. 1996**).

Durante este período se ha observado que se produce un abrupto cambio en la concentración de FSH y en la pulsatilidad de la LH; cambio que puede actuar como estímulo para el inicio de la diferenciación de los futuros folículos dominantes y los subordinados (Figura 3). Estos cambios hormonales refrendan la hipótesis que indica la necesidad de una cantidad suficiente de LH y concentraciones mínimas de FSH para que se facilite la desviación folicular (**Guinther et al. 1998**).

2.3.2. Selección

El proceso de selección se caracteriza por el bloqueo ejercido por el folículo más desarrollado sobre los restantes folículos de la misma cohorte de desarrollo, este efecto se produce a través de sustancias hormonales como las inhibinas y el estradiol, las cuales actúan disminuyendo la liberación de FSH, de manera tal que estos niveles insuficientes de gonadotropinas afectan el desarrollo de los folículos más pequeños. Durante esta fase un grupo reducido de folículos escapan al proceso de atresia.

2.3.3. Dominancia

Con dominancia nos referimos al desarrollo de un folículo, mientras los restantes sufren un proceso de atresia fisiológica. Este folículo dominante es

más sensible a la acción de las gonadotrofinas que los restantes, por lo que a pesar de influir negativamente en la liberación de gonadotropina FSH, no sufre atresia, lo cual favorece también el IGF-1 (**Blanco et al. 1997**)

Como se ha indicado anteriormente, el primer folículo dominante pertenece a una cohorte de folículos de cuatro a seis milímetros aparecidos el primer día del ciclo (definiéndose el día del celo como día cero del ciclo) alcanzando su máximo tamaño (13-16 milímetros) entre los días siete y ocho, pudiendo permanecer estable hasta el día 11, momento en que inicia su regresión la que concluye el día 16. Un segundo folículo dominante puede ser ovulatorio o no, dependiendo del número de ciclos (2 ó 3 ondas) de maduración; en este caso, si el ciclo es de solamente dos ondas, el segundo folículo dominante aparece el día 11, pero si el ciclo se caracteriza por tres ondas, entonces aparecerá el día ocho para hacerse evidente un tercer folículo dominante, en este caso ovulatorio, el día 16 del ciclo (**Fortune et al. 1988; Kpnof et al. 1989; Roche y Boland, 1991**).

2.4. Papel de las Hormonas en el Crecimiento Folicular

El control endocrino del crecimiento y desarrollo de nuevos folículos se atribuye a la gonadotropina FSH, toda vez que en los bovinos se ha encontrado un incremento en los niveles de esta hormona cuando se cauterizan los folículos dominantes. De igual manera, la administración de líquido folicular estimula la aparición de una cohorte de folículos con diámetros de cuatro a cinco milímetros, que ocurre entre las 24 a 48 horas después de la

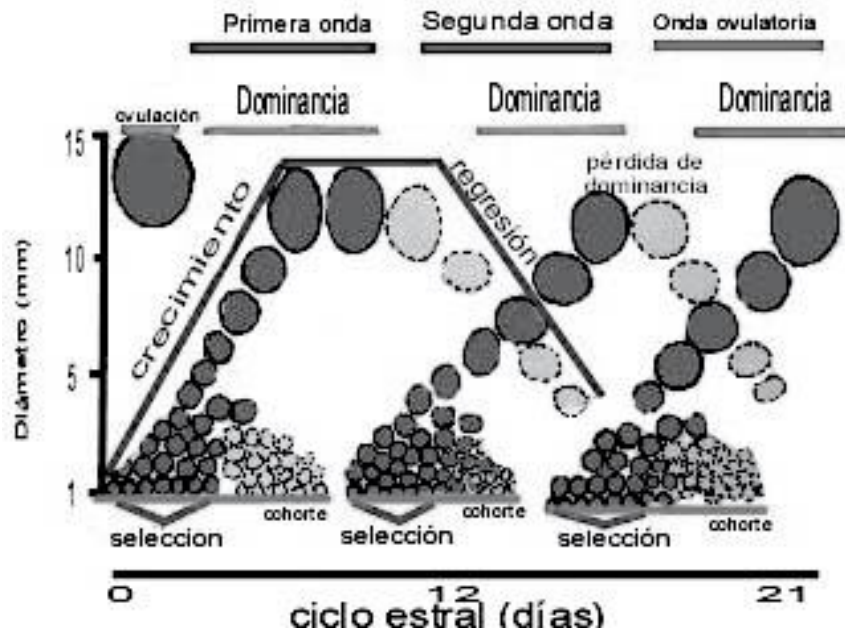
administración. Esta competencia de los folículos por la FSH circulante es la responsable de la dominancia; y cuando se elimina el folículo dominante, el subordinado más cercano al dominante ocupa su lugar (**Kastelick, 1990; Ko, 1990; Adams, 1993; Sunderland, 1994**).

La FSH es indispensable para la secreción de estrógenos foliculares ya que estimula el crecimiento, la mitosis y la completa diferenciación de las células de la granulosa de los folículos preovulatorios grandes, para que adquieran receptores para la LH y desarrollen su máxima actividad aromatizante. Cerca del 90 por ciento del estradiol secretado por los ovarios se deriva de estos folículos estimulados por la FSH (**Rivera, 1993**).

La transformación de los folículos ováricos durante el ciclo estral está regulada por las concentraciones de P4 en plasma que actúa vía feedback negativo, provocando un efecto en la secreción de LH. Esta baja frecuencia en los pulsos de LH durante la fase luteal no es suficiente para mantener el continuo crecimiento de los folículos dominantes. Debido a esta situación se ha formulado la hipótesis de que la inadecuada secreción de andrógenos por la teca interna limita la subsecuente función de las células de la granulosa, necesaria para terminar el desarrollo y la función de los folículos dominantes, los cuales no pueden suprimir prolongadamente el crecimiento de otros folículos y por ello otra nueva onda de desarrollo folicular se inicia (**Savio, 1993**).

El papel de la FSH en la selección y dominancia ha sido demostrado por la administración de FSH exógena durante dos días dentro del período en que se prevé la selección de un folículo, esta aplicación retrasa la esperada selección, alterando significativamente los perfiles de crecimiento del dominante y aumentando el crecimiento y retrasando la regresión del primero y segundo folículo subordinado (Adams, 1993).

FIGURA 3. REPRESENTACION DE LA DINAMICA FOLICULAR.



Fuente: Jiménez, C. 2009.

2.5. Fisiología Hormonal

La regulación de la actividad sexual está regulada por el sistema hipotálamo-hipófisis-ovárico. El hipotálamo y la hipófisis anterior que de manera conjunta

con los órganos reproductivos aseguran el ritmo de reproductivo (**Hafez, 1987; Cunningham, 1997; Echeverría, 2004a; 2004b; 2005a; 2005b**). Sin embargo, con el advenimiento comercial de muchas hormonas, se ha abierto un campo a la manipulación del ciclo estral para la transferencia de embriones y la sincronización de celos tanto en vacas donantes como receptoras. Dentro de este grupo de hormonas se encuentran las más utilizadas son las siguientes:

2.5.1. La Gonadoliberina (GnRH)

Es un decapeptido que se produce en las neuronas secretoras del sistema nervioso central y su secreción está condicionada por factores externos (fotoperiodo, feromonas, estrés, nutrición) e internos (estrógeno, progesterona) y su acción es ejercida a nivel de las células gonadotróficas de la hipófisis activando la síntesis y liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (**Gibbons y Cueto, 1995**)

Estas hormonas tienen dos tipos de secreción, una tónica y una cíclica. La primera de ellas es basal y no muestra variación estacional y tiene control endocrino ejercido por las hormonas esteroideas secretadas por el ovario (estradiol y progesterona). La secreción cíclica de LH y FSH, propia de la hembra, muestra una importante variación durante el período preovulatorio. Estas oleadas o picos pre-ovulatorios son los responsables de la ovulación, y tiene una duración entre seis y 12 horas en la mayoría de las especies domésticas.

El pico preovulatorio de LH se inicia con un importante incremento en la concentración circulante de estrógenos, el cual tiene un efecto positivo sobre el eje hipotálamo-hipofisario induciendo la descarga de GnRH y como consecuencia de éste la descarga de LH. El estrógeno actúa a dos niveles: a nivel hipotalámico, estimulando las áreas preópticas y supraquiasmáticas, aumentando la descarga de GnRH, y a nivel de hipófisis, aumentando la sensibilidad de las células gonadotrofas a la GnRH, lo que provoca finalmente un aumento importante en la descarga de LH. Este pico de LH provoca la elevación rápida de esteroides gonadales (estradiol y progesterona), y de prostaglandina en el líquido folicular., desempeñando esta última un rol primordial en los mecanismos íntimos de la ovulación (**Bo, 1998**).

Los tratamientos superovulatorios con GnRH inducen a la ovulación del folículo dominante y emergencia de una nueva onda folicular de uno a dos días después. (**Rieger et al., 1991**) En novillas *B. tauros* x *B. indicus* la administración de la GnRH en un estado cualquiera del ciclo estral induce ovulación a solo el 45.7 por ciento (**Hafez y Hafez, 2002; Ocampo, 2002**) de las novillas (**Poretsky, 1987**). Las bajas tasas de preñez seguida a la administración de GnRH ha sido observado en ganado *B. indicus* en regiones tropicales (**Gong, 1991**). Los resultados de estos trabajos ponen en duda la eficiencia de la GnRH para sincronizar la onda emergente en vacas cebú. (**Baruselli, et al., 2005**).

2.5.2. Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Esta hormona es una glicoproteína sintetizada a nivel de la hipófisis anterior y participa en la regulación ovárica. La FSH favorece el crecimiento y la maduración folicular y de los ovocitos. Además induce en los folículos maduros la presentación de los receptores para la LH (hormona luteinizante) y mantiene la liberación de los estrógenos. Su secreción es continua, presentando dos picos; uno en conjunto a la descarga pre-ovularia de LH y otro de menor intensidad dos o tres días después.

2.5.3. Hormona Luteinizante (LH)

La LH participa con la FSH en la maduración final del folículo, produce la liberación del ovocito (ovulación) y la formación del cuerpo lúteo a partir del folículo que ovulo.

2.5.3.1. Modo de Acción

Esta hormona incrementa su concentración durante periodos cortos de tiempo en forma de pulsos que decrecen progresivamente hasta su nivel basal. Esta frecuencia de pulsos está supeditada a la estimulación de las células hipofisarias por parte de la GnRH y cada pulso corresponde con un pulso de GnRH. Durante la fase pre-ovulatoria el incremento en la secreción de estrógenos liberados por los folículos ejerce un retrocontrol positivo sobre el eje hipotálamo-hipofisario que induce el denominado “pico pre-ovulatorio de LH” (Gibbons y Cueto, 1995).

2.5.4. Progesterona (P₄)

La exposición a niveles elevados de progesterona seguida de su declinación (priming de progesterona) parecen ser pre-requisitos para una diferenciación normal de las células de la granulosa, una expresión normal del celo y el desarrollo post ovulatorio del cuerpo lúteo con una fase luteal normal (**Bo, 1998**).

El mecanismo involucra el efecto del incremento de la frecuencia de los pulsos de LH sobre la producción de estrógenos foliculares, desarrollo de los receptores de LH y luteinización. La presencia de una fuente exógena de progesterona permite imitar la acción inhibidora de los niveles luteales de ésta hormona sobre la secreción pulsátil de LH, con la supresión del crecimiento del folículo dominante y el consiguiente desarrollo sincrónico de una nueva onda de desarrollo folicular. El retiro de ésta fuente exógena de progesterona permite el aumento de la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH y el crecimiento de un folículo dominante que ovulará entre 48 y 72 horas después.

2.5.4.1. Modo de Acción

La progesterona exógena (liberada por los D.I.B. o inyectada) es estructuralmente idéntica a la endógena y tiene un rol importante sobre la dinámica folicular ovárica. Los niveles supraluteales (>1 ng/ml) obtenidos a los pocos minutos de la introducción provocan la regresión del folículo dominante y aceleran el recambio de las ondas foliculares, este cese de la secreción de productos foliculares (estrógeno e inhibina) produce el aumento de FSH que va a ser la responsable del comienzo de la emergencia de la siguiente onda folicular. Por otro lado la suspensión del suministro de la P_4 exógena provoca la caída de P_4 a niveles subluteales (< 1 ng/ml) que inducen el incremento de la frecuencia de los pulsos de LH, el crecimiento y la persistencia del folículo dominante con concentraciones muy altas de Estradiol que provocan por un lado el celo y a nivel endócrino inducen finalmente el pico de LH que es seguido por la ovulación (**Bo, 2002**).

2.5.5. Prostaglandina ($Pg2\alpha$)

Los prostanoïdes son metabolitos obtenidos del ácido araquidónico a través de la vía metabólica conocida como ciclo-oxigenasa. Entre ellos puede mencionarse a la $PGF2\alpha$, sustancia con actividad marcada sobre el control del ciclo estral. Estructuralmente es un ácido graso insaturado compuesto por 20 átomos de carbono. Contiene un anillo ciclopentano y dos cadenas laterales. Su mecanismo de acción se halla estrechamente relacionado con receptores específicos de membrana que activan una proteína G específica desencadenando la cascada de AMPc y la correspondiente liberación de Ca

por medio del fosfatidil inositol (**Willis y Smith, 1994; Gether y Kobilka, 1998; Narumiya et al., 1999**).

2.5.5.1. Modo de Acción

La F2 α es responsable de inducir la luteolisis hacia el final del diestro o gestación. Cuando son administradas en la segunda mitad de la gestación, promueven la regresión luteal con lo cual producen un descenso de la progesterona plasmática e impulsan las contracciones del miometrio conjuntamente con la oxitocina provocando de esta manera el aborto o la reabsorción de los fetos (**Vane y Botting, 1994; Sharif et al., 1998; Narumiya et al., 1999; Niswender et al., 1988; de la Sota et al., 2002**).

2.5.6. Gonadotrofina Sérica de Yegua Preñada (PMSG) o Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG).

La Gonadotrofina coriónica equina (eCG, PMSG) es una hormona glicoproteica secretada en las copas endometriales de las yeguas gestantes, entre los días 40 y 120 de gestación aproximadamente. Desde el punto de vista endocrinológico es importante resaltar dos valiosas características de la eCG que la distinguen de otras hormonas glicoproteicas, la primera es el hecho de poseer actividad FSH (folículo estimulante) y LH (luteinizante) cuando es administrada en especies distintas al equino, en donde sólo posee actividad LH y la segunda característica es su alto contenido en carbohidratos, hecho que le confiere características propias desde el punto de vista farmacocinético, como una vida media prolongada que favorece su uso en

una sola dosis a diferencia de la FSH cuya vida media es extremadamente corta y requiere aplicaciones múltiples.

2.5.6.1. Modo de Acción

Los progestágenos utilizados en muchas especies en forma previa, inhiben la liberación de hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) de la hipófisis, frenando el desarrollo folicular y la ovulación hasta el momento deseado. Cuando los progestágenos son retirados, la concentración de Progesterona en sangre cae rápidamente con lo cual el animal puede entrar en celo. La administración de eCG o PMSG en ese momento potencia las gonadotrofinas endógenas en el estímulo del desarrollo folicular y la ovulación.

2.5.7. Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG)

La gonadotrofina coriónica humana (hCG) posee la acción biológica de la gonadotrofina hipofisaria luteinizante (LH) en los animales. El principal efecto de las gonadotrofinas es promover la gametogénesis o, en su defecto, la producción de esteroides sexuales. Los receptores de LH/hCG se expresan en el ovario en las células de la teca, las intersticiales, las de la granulosa madura de folículos antrales y preovulatorios, y luteínicas. En el testículo los receptores de LH/hCG se encuentran únicamente en las células de Leydig.

El efecto general de la LH/hCG en el ovario es inducir la ovulación y estimular la síntesis de progesterona. Sobre las células de la Teca la LH/hCG estimula

la síntesis de novo de andrógenos, los cuales pasan a la granulosa por difusión donde son aromatizados por acción de la FSH pasando a estrógeno los cuales se liberan a circulación. La diferenciación de las células de la granulosa durante el crecimiento folicular incluye la adquisición (dependiente de FSH y estradiol) de receptores de LH/hCG, lo que prepara a las células de la granulosa para responder al brote preovulatorio de LH.

2.5.7.1. Modo de Acción

Durante la foliculogénesis, normalmente sólo un folículo (el folículo dominante) se selecciona del fondo común de folículos en crecimiento, para que siga creciendo hacia el folículo preovulatorio o de Graff. La aplicación de LH/hCG en éste momento provoca la ruptura del folículo preovulatorio, y la liberación del óvulo. Durante la Fase Lutéica del ciclo estral, la LH/hCG estimula la producción de progesterona por el cuerpo lúteo. La Progesterona producida es fundamental en la preparación del útero para la implantación del óvulo fecundado. La hCG posee acción biológica LH, por lo cual induce la ovulación y la formación del cuerpo lúteo en la mayoría de las especies domésticas. Esta acción permite el uso de la hCG con el objetivo de sincronizar la ovulación en animales cíclicos, o de estimular el desarrollo del cuerpo luteo y la secreción de progesterona en animales que lo requieran.

2.6. Estimulación Ovárica para la Ovulación Múltiple

El objetivo principal de los tratamientos de superovulación en vacas es producir un gran número de embriones transferibles que resulten en una alta probabilidad de preñez. Sin embargo, la respuesta a estos tratamientos es muy variable y difícil de predecir. En un trabajo donde se incluyeron 2.048 colecciones de embriones en donantes bovinas, se obtuvo un promedio de un embrión por cada 11.5 ovocitos y 6.2 embriones transferibles por vaca.

Sin embargo, la variabilidad fue muy grande, tanto en la respuesta a la superovulación como en la calidad de los embriones. Esto debido a que se está trabajando con organismos biológicos que aunque son de la misma especie tienen respuestas fisiológicas variables y se enfrentan a un medio que también influye en la respuesta individual de estos individuos (**Mapletoft et al., 1994**).

Experimentos y pruebas de campo realizados durante la década de los 80 llevaron a la conclusión general que los tratamientos superovulatorios iniciados durante los días 9 ó 10 después de detectarse el celo resultan en una mejor respuesta superovulatoria que aquellos iniciados antes (días 2 a 6) o después (día 12 o 13). Esto es debido a que durante el ciclo estral bovino hay dos o tres ondas de desarrollo folicular y en la mayoría de las vacas la segunda onda folicular comienza, en promedio, entre los días 9 y 10. No obstante, hay una gran variación individual y la segunda onda puede comenzar más temprano (día 6) o más tarde (día 12) (**Carvalho, 2004**).

Estudios realizados durante los últimos cinco años han demostrado claramente que los tratamientos superovulatorios deben iniciarse al comienzo de una onda de desarrollo folicular, antes de la selección del folículo dominante, para obtener la mejor respuesta posible. La respuesta superovulatoria fue significativamente mayor cuando los tratamientos se iniciaron el día antes o el día de comienzo de la onda folicular (ya sea de la primera o segunda onda) que los tratamientos iniciados uno o dos días después. Si tenemos en cuenta estos resultados, la probabilidad que el comienzo de la superestimulación coincida con el inicio de la onda folicular es menor al 20 por ciento (1 de 5 ó 7 días) y significa que el 80-90 por ciento de las veces no iniciamos los tratamientos superovulatorios en el período óptimo. Además, la necesidad de sincronizar el celo previo (o "base") en grupos de donantes para comenzar los tratamientos 8 a 12 días después, implica mayor trabajo del personal, más demora en la programación y el riesgo de una dispersión de celos que obligue a colectar embriones en distintos días.

Una alternativa viable para lograr una mejor respuesta superovulatoria y obviar los problemas logísticos de programación, es controlar la dinámica folicular y comenzar los tratamientos en el momento más oportuno (que el veterinario disponga, no la vaca) (**Basurelli, 2005**). En este sentido, alternativas para controlar la emergencia de la onda folicular en un estado aleatorio del ciclo estral, sin necesidad de detectar un calor para establecer un estro como base, podría facilitar el manejo de las donadoras ***B. indicus*** y

posibilitaría un aumento en la eficiencia de los programas de transferencia de embriones en vacas Cebú (**Basurelli, 2005**).

2.7. La Superovulación (SOV) u Ovulación Múltiple

La superovulación (SOV) en la vaca es un paso muy importante en los procesos de transferencia de embriones (TE). La vaca es un animal monotoco, por lo que generalmente libera solo un óvulo en un ciclo estral. El objetivo principal de la SOV es estimular extensamente el desarrollo folicular en cada ciclo estral. Vacas y novillas que han sido tratadas pueden liberar 10 o más óvulos viables durante un ciclo estral; aproximadamente un 85 por ciento de las vacas donadoras fértiles pueden responder a tratamientos de SOV con un promedio de cinco embriones transferibles. Algunas vacas son tratadas repetidamente en un intervalo de 60 días, presentando un decremento en la producción de embriones (**Gong et al., 1991**).

Para inducir la SOV se puede usar gonodotropinas, como gonodotropina coriónica equina (eCG), hormona folículo estimulante (FSH) y gonodotropina coriónica humana (hCG) las cuales pueden ser administradas a las donadoras vía intramuscular o subcutánea, pero en la actualidad la mayoría de los tratamientos son efectuados con FSH debido a los mejores resultados obtenidos en la tasa de ovulación como en la calidad de los embriones que utilizando eCG. (**Gong et al., 1991**).

Para estimular los folículos a madurar, la FSH debe ser repetidamente inyectada, usualmente ocho veces en cuatro días debido a su corta vida media (dos a cinco horas en el cuerpo de la vaca) en contraste con la dosis única de eCG. El tratamiento se hace los días cuatro, cinco, seis y siete días después de iniciar el estro con un cuerpo lúteo (CL) funcional en el ovario. **(Gong *et al.*, 1991).**

De acuerdo a este mismo autor, antes de iniciar el tratamiento para la SOV, las condiciones siguientes deben ser cumplidas para tener éxito en la producción de muchos embriones de buena calidad:

- Deberá comprobarse la normalidad del ciclo estral, para ello deben observarse por lo menos dos ciclos estrales. La donadora debe mostrar el celo y el intervalo debe ser normal es decir, entre 18 y 24 días.
- Se debe confirmar que no presente ninguna inflamación uterina como endometritis. La endometritis sub-clínica a veces es difícil de detectar por lo tanto debe realizarse una palpación del útero en la fase lútea, a veces es necesaria la inspección del moco uterino durante el celo.
- La superovulación puede iniciarse entre los días nueve a 14 del ciclo estral en las donadoras que presenten un buen CL, ovarios pequeños y de parénquima firme puede resultar en una baja respuesta al

tratamiento, debido a que el ovario presenta menor número de vesículas foliculares que son los que responden al tratamiento superovulatorio.

Diversos estudios prueban que la respuesta superovulatoria es significativamente mayor cuando los tratamientos son iniciados el día antes o el día del comienzo de la onda folicular que los tratamientos iniciados uno o dos días después; y de esta forma, iniciando los tratamientos superovulatorios al comienzo de una onda de desarrollo folicular, antes de la selección del folículo dominante, obtendremos la mejor respuesta posible (**Bo y Mapletoft, 1999; Bo et al., 2004**).

Según **Fernández (2003)** superovulaciones iniciadas a partir del cuarto día de la fase de crecimiento de un folículo dominante conducen a respuestas muy pobres en lo que refiere a número de ovulaciones, debido a que el proceso de atresia de los folículos subordinados de esa onda ya está avanzado y no es posible "rescatar" ya muchos de esos folículos. Por el contrario, tratamientos superovulatorios comenzados simultáneamente con el inicio de una onda de desarrollo folicular conseguirán reclutar o rescatar de la atresia mayor número de folículos.

- Factores externos que afectan la respuesta superovulatoria
 - ✎ Nutrición
 - ✎ Periodo del año o estación
 - ✎ Manejo

- ✎ Semen
- Factores fisiológicos que afectan la respuesta superovulatoria
 - ✎ Especie, raza, edad, individuo, estatus fisiológico (lactancia), fertilidad
 - ✎ Dinámica folicular y características de las ondas foliculares
 - ✎ Mecanismos de superovulación
 - ✎ Factores farmacológicos
 - ✎ Tipo de FSH
 - ✎ Productos y potencia
 - ✎ Relación de FSH/LH presente en el preparado comercial y culmina con el éxito de la ovulación.
 - ✎ Dosis
 - ✎ Frecuencia de administración
 - ✎ Protocolos: tradicional y en tiempo fijo
 - ✎ Alternativas para mejorar la respuesta superovulatoria
 - ✎ Sobreestimulación

2.8. Factores que Intervienen en la Respuesta Superovulatoria

Existen factores que intervienen en el éxito de los programas de superovulación y transferencia de embriones y que deben ser considerados, dentro de los cuales se encuentran:

2.8.1. Factores Externos que Afectan la Respuesta Superovulatoria

Factores tales como época del año, nutrición, manejo y la calidad seminal pueden afectar la respuesta de los tratamientos superovulatorios de forma directa o indirecta. En un estudio realizado por **Hasler et al. (1983)** donde se evaluó la calidad de los embriones recuperados durante seis años no se encontró efecto de año, estación ni mes sobre el número de estructuras recuperadas pero sí diferencias significativas sobre la tasa de fertilización (Cuadro I).

CUADRO I. NUMERO DE ESTRUCTURAS RECUPERADAS Y CALIDAD DE LOS EMBRIONES EN PROGRAMAS SOV. (1980-1986) (Adaptado de Hasler et al. 1983).

Factor	N	Total de estructuras	No. embriones	Tasa de fertilización
Invierno	178	11,2	6,9	65 ^a
Primavera	171	11,1	6,3	61b
Verano	187	9,2	6,4	42b
Otoño	130	9,4	6,0	50c

La calidad del semen tiene un efecto muy importante sobre el número de embriones obtenidos. De acuerdo a **Chenoweth (2007)** si en un lavado se recuperan solamente embriones de mala calidad, este efecto no solo se puede deber a la respuesta superovulatoria sino a la calidad del semen (Cuadro II).

CUADRO II. EFECTO DE LA CALIDAD SEMINAL SOBRE LA TASA DE FERTILIZACION DE EMBRIONES RECUPERADOS (Adaptado de Chenoweth 2007).

Calidad seminal	Fertilización (%)	Embriones excelentes (%)
Excelente	82,1A	61,2 ^a
Bueno	67,6b	55,7b
Regular	58,3c	53,9c
Malo	51,8d	33,7d

Otro factor que hay que considerar es el momento de la inseminación. Un estudio en realizado por **Dalton *et al.* (2000)** utilizando vacas Holstein demostró que la tasa de fertilización es mayor si la inseminación se realiza 24 horas después de iniciado el celo, comparado con inseminaciones más tempranas (Cuadro III), lo que confirma la práctica de inseminar las vacas cada doce horas mientras la vaca siga en celo.

CUADRO III. EFECTO DEL MOMENTO DE LA INSEMINACION SOBRE LA TASA DE FERTILIZACION DE VACAS SOV. (Adaptado de Dalton *et al.*, 2000).

	IA 0h	IA 12h	IA 24h
Total de estructuras	195	207	127
Tasa de fertilización (%)	29a	60b	81c

P<0,01

2.8.2. Factores Fisiológicos que Afectan la Respuesta Superovulatoria

La aplicación de sustancias que estimulan la superovulación sobrepasa los mecanismos inhibitorios fisiológicos que hacen que una vaca ovule uno o dos ovocitos por cada ciclo. El éxito de estos tratamientos va a esta determinado

por el estado cíclico del ovario al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio, y de los mecanismos fisiológicos y genéticos que afectan la respuesta superovulatoria (**Jiménez, 2009**).

Aspectos tales como la especie, la raza, la edad, el número de partos, el estado lactacional, la fertilidad de la vaca, el estatus sanitario e incluso el individuo *per se*, deben tomarse en cuenta cuando se va establecer un programa de transferencia de embrión.

2.8.2.1. Especie y Raza.

Algunos autores indican que existe gran variabilidad en la respuesta a los tratamientos superovulatorios y que los mismos dependen de la especie. Sin embargo, **Krinninger III et al. (2003)** reportan que esta diferencia no parece ser real (Cuadro IV), por lo que faltarían estudios más significativos que corroboren esta creencia. Ante esta situación, se deben ajustar los protocolos a cada circunstancia ya que factores de manejo, temperatura, edad etc., pueden causar una impresión errada de la dificultad en superovular una raza o especie en particular.

CUADRO IV. COMPARACION DE LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA CON FSH EN VACAS BRAHMAN Y HOSTEIN (Guzmán, 2002).

	Brahman	Holstein
Tasa de ovulación	15,2±4,14	16,6±4,14
Embriones recuperados	9,3±2,93	10,9±2,93
Embriones recuperados (% de ovulación)	66,0±9,6	69,0±9,6

En cuanto a la raza, hay cierta información acerca de que ciertas razas no producen embriones tan resistentes como otros. Por ejemplo, los embriones congelados / descongelados de la raza Jersey presentan menores tasas de preñez que las demás razas (**Steel, 2004**).

2.8.2.2. Edad y Estado de Lactancia

Hasler et al. (1983) reporta, en base a un estudio realizado, que embriones recuperado de vacas mayores de 15 años presentaban una tasa de preñez de más bajas (Cuadro V). Otro estudio, realizado por **Leroy et al. (2005)** y en donde se evaluó la calidad de los embriones obtenidos, se encontró que las vacas Holstein lactantes produjeron un porcentaje menor de embriones de buena calidad comparado con vacas no lactantes o con novillas. Resultados similares reporta **Moreira (2002)** en otro estudio en donde observó un mayor número de embriones de mejor calidad en vacas no-lactantes que en vacas lactantes (Cuadro VI).

CUADRO V. EFECTO DE LA EDAD SOBRE EL NUMERO DE EMBRIONES PRODUCIDOS (Hasler, 1983).

Edad	N	Estructuras/ donante	Embriones/ donante	Fertilización (%)	Recuperación (%)
Novillas	28	6,1	3,8	69	57
Novillas primer parto	26	8,0	5,3	67	80
3-6 años	282	10,6	6,8	67	90
7-10 años	224	10,6	6,9	67	83
11-14 años	64	9,7	5,3	57	83
>14 años	9	5,6	2,6	50	97

CUADRO VI. NUMERO DE EMBRIONES Y OVOCITOS RECUPERADOS SIN FERTILIZAR, EMBRIONES DEGENERADOS, EMBRIONES TRANSFERIBLES Y NUMERO DE EMBRIONES POR LAVADO DE ACUERDO A LA ETAPA DE DESARROLLO Y CALIDAD PARA LAS DONANTES LACTANTES Y NO LACTANTES (LSD±S.E) (adaptado de Guzmán, 2002).

Variable	Donantes lactantes	Donantes no lactantes	P-valores
Total oocitos o embriones recuperados	5,5 ± 2,4	13,3 ± 2,0	<0,01
Oocitos sin fertilizar	0,9 ± 0,6	3,9 ± 0,5	<0,04
Embriones degenerados	0,4 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,34
Embriones transferibles	4,2 ± 2,1	8,6 ± 1,8	<0,04
Calidad embrionaria			
Excelente/ bueno	3,6 ± 1,8	7,1 ± 1,5	<0,07
Pobre	0,6 ± 0,5	1,5 ± 0,4	<0,05

2.8.2.3. Fertilidad de la Vaca

Un estudio realizado por **Hasler *et al.* (1983)** analizó los registros de 1000 donadoras de la raza Holstein. Los mismos se dividieron en dos grupos: vacas con buena fertilidad y vacas con baja fertilidad. Los resultados indicaron que las vacas con buena fertilidad produjeron embriones más viables y con mejores tasas de preñez que las vacas de baja fertilidad (68 y 58 por ciento, respectivamente). Estos resultados confirman la ventaja de superovular vacas con historia de fertilidad de buena a regular, ya que los embriones obtenidos pueden resultar en tasas de preñez aceptable al ser transferidos a receptoras sanas (Cuadro VII).

CUADRO VII . COMPARACION DE LAS TASAS DE PRODUCCION DE EMBRIONES DE VACAS FERTILIES O INFERTILES (Hasler, et.al., 1983).

	Fértiles	Infértiles
N	666	318
Fertilización	66	42%*
Embriones/ donante	6,4	2,4*
Donante sin embriones (%)	14	51*
Tasa de preñez	68	58*

2.9. Inducción de la Superovulación en la Donante

El objetivo de la transferencia de embriones es obtener a partir de progenitores de alto mérito genético, el mayor número posible de descendientes utilizando el útero de receptoras de menor valor económico para llevar la gestación a término.

Para lograr dicho objetivo es necesario, en primera instancia, contar con un número elevado de embriones transferibles. A tal fin, debe provocarse en la hembra donante una estimulación ovárica adecuada mediante la administración de gonadotrofinas. Esto debe complementarse con un régimen óptimo de inseminación artificial, utilizando semen de muy buena calidad.

Donaldson (1984e), demostró que a pesar de que se cumpla con todos estos requisitos, la respuesta superovulatoria (RSOV) resulta muy variable. En un estudio retrospectivo que incluyó 1263 donantes, el autor encontró que

solamente el 68 por ciento de las hembras inducidas a superovular produjeron embriones transferibles. El 32 por ciento restante lo integraron:

- ☞ 7% de donantes en las que no se produjo estimulación ovárica.
- ☞ 7% de donantes en las que no se recolectaron ni ovocitos ni embriones.
- ☞ 17% de donantes en las que no se obtuvieron embriones transferibles.
- ☞ 1% de donantes en las que no se efectuó la recolección de embriones porque presentaron celo antes de administrársele la prostaglandina F2 (Pg2 α) durante el tratamiento hormonal.

Estos porcentajes, con algunas variaciones, se repiten cada vez que se analiza la producción de embriones de un número significativo de donantes superovuladas y a pesar de los avances que se han registrado en el conocimiento de la fisiología reproductiva de la hembra bovina en los últimos diez años, la variabilidad en la respuesta superovulatoria permanece en niveles similares a lo observado a fines de la década del setenta (**Elsden et al., 1978**).

Para reducir tal variabilidad es necesario en primer lugar, optimizar las preparaciones hormonales y luego efectuar el tratamiento en hembras fértiles, en el momento adecuado y en un ambiente propicio.

Los tratamientos hormonales deben producir un número elevado de embriones transferibles y ser de fácil aplicación. No obstante la elección de una u otra hormona para la SOV depende de la disponibilidad, precios,

personal, condiciones de tenencia de las donantes, interés particular y otras consideraciones que están en manos del profesional que debe tomar la decisión.

2.10. Protocolos de Superovulación (SOV)

2.10.1. Superovulación con FSH

Una de las metodologías para inducir la superovulación (SOV) en vacas donantes es la utilización de Hormona Folículo Estimulante (FSH), la cual según diversos autores produce una alta cantidad embriones y de buena calidad, sin embargo, por su corta duración en sangre, es necesario aplicarlas en intervalos de 12 horas para mantener concentraciones adecuadas esta hormona en sangre y lograr buenos resultados (Cuadro VIII). Debido a su rápida degradación en el organismo resulta necesario su suministro en intervalos (12 horas) que garanticen los niveles de estimulación ovárica necesarios por un período de tiempo determinado (cuatro a cinco días).

CUADRO VIII . RESPUESTA SOV A LA APLICACIÓN DE UNA SOLA INYECCION SUBCUTANEA FRENTE A DOS VECES AL DIA INTRAMUSCULAR DE FSH (Folltropin-V. 400mg) 8 DIAS DESPUES DE LA OVULACION EN EL GRUPO CONTROL O 5 DIAS DESPUES DE PUESTO EL IMPLANTE AURICULAR (Adaptado de Bó, 1996).

	Control		Implante	
	Inyección sencilla	Inyección dos veces al día	Inyección sencilla	Inyección dos veces al día
No. animales	18	16	19	18
CL	22,0±3,5	23,7±3,7	27,0±3,1 ^a	16,6±3,4
No. animales con <2 CL	1	1	0	2
Total estructuras / embriones	14,2±2,5	14,1±2,7	13,2±1,4	10,6±1,8
Embriones transferibles	5,4±1,5	5,5±1,7	5,4±1,0	3,9±1,5

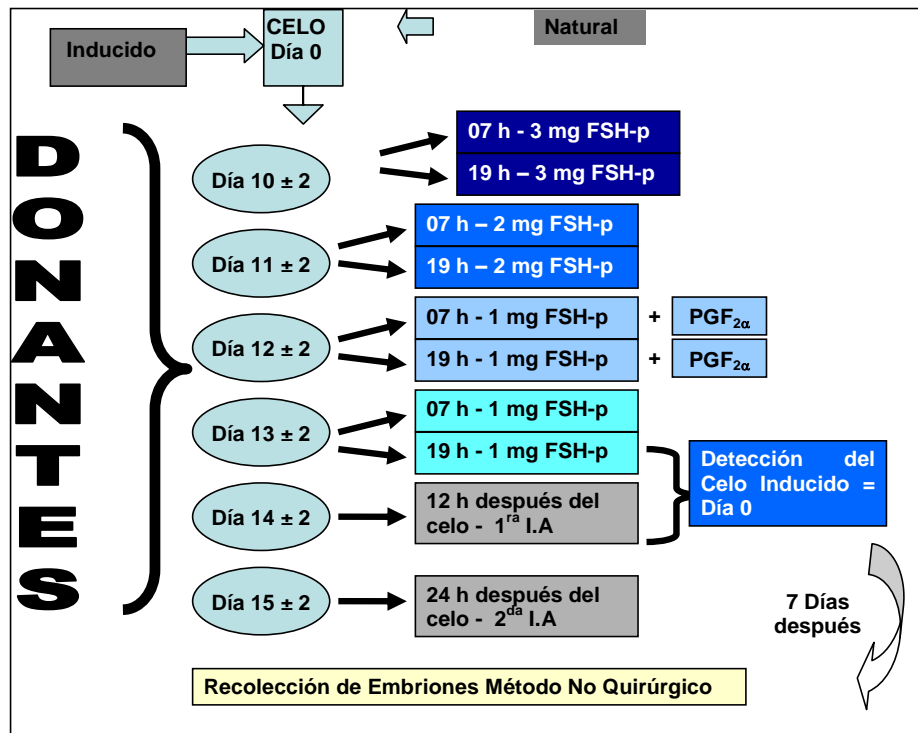
^a P<0,09

De acuerdo con **De Armas (1996)** niveles de progesterona (P_4) son necesarios en el inicio de la SOV en presencia de un cuerpo lúteo activo, sin embargo con la aplicación de FSH purificada no se incrementan los niveles de P_4 como cuando se emplea el suero de yegua preñada (PMSG) o la hormona coriónica humana (hCG) u otros preparados hipofisarios menos puros. Por otra parte, **Bernal (2007)** ver Figura 4, indica que el inconveniente de utilizar la FSH, radica en la constante manipulación de los animales, lo cual, para algunas razas, principalmente las cebuínas, resulta estresantes y afectando la respuesta a la SOV. De igual manera sugiere que por el alto costo de esta hormona se debe buscar alternativas que resulten económica y biológicamente viables.

Estudios realizados por **Lindsell et al., (1986)** y **Savio et al., (1988)**, demuestran que la respuesta a los tratamientos con FSH son significativos cuando la contaminación es mínima. En ese mismo sentido **Schmidt et al., (1988)**, señalan que al haber una contaminación mínima con hormona luteinizante (LH) se pueden ver afectar las primeras etapas de los óvulos fertilizados dando como resultado una disminución en el número de embriones transferibles. Otro factor que afecta la respuesta de la FSH en los protocolos de SOV es que en el trópico es que la mayoría de las hembras donantes no son animales grasos (**De Armas, 1996**) presentado resultados variables.

En términos generales con la FSH se obtienen resultados estables (de cuatro a ocho embriones transferibles) y consistentes a pesar de su alto valor cuando la comparamos con la PMSG., siendo más eficientes en la SOV de animales con sangre cebuína.

FIGURA 4. ESQUEMA DE APLICACIÓN DE FSH EN PROTOCOLOS DE SOV. (Adaptado de Bernal, 2007.)



2.10.2. Superovulación con PMSG.

De acuerdo con **De Armas (1992)** y **Bernal (2007)**, una de las estrategias más viables y económicas para inducir la SOV en vacas donantes, es la utilización del suero de yegua preñada (PMSG), a razón de 1000-1500 Unidades Internacionales (UI) en novillas y 1500-2500 UI en vacas, ya que es de fácil aplicación y con buena respuesta superovulatoria (Figura 5). Sin

embargo; **Duch (1986)**, señala que existe un efecto negativo cuando se usan dosis altas de PMSG debido a su alta persistencia en sangre por lo que, indica, debe ser acompañada por un anti-PMSG.

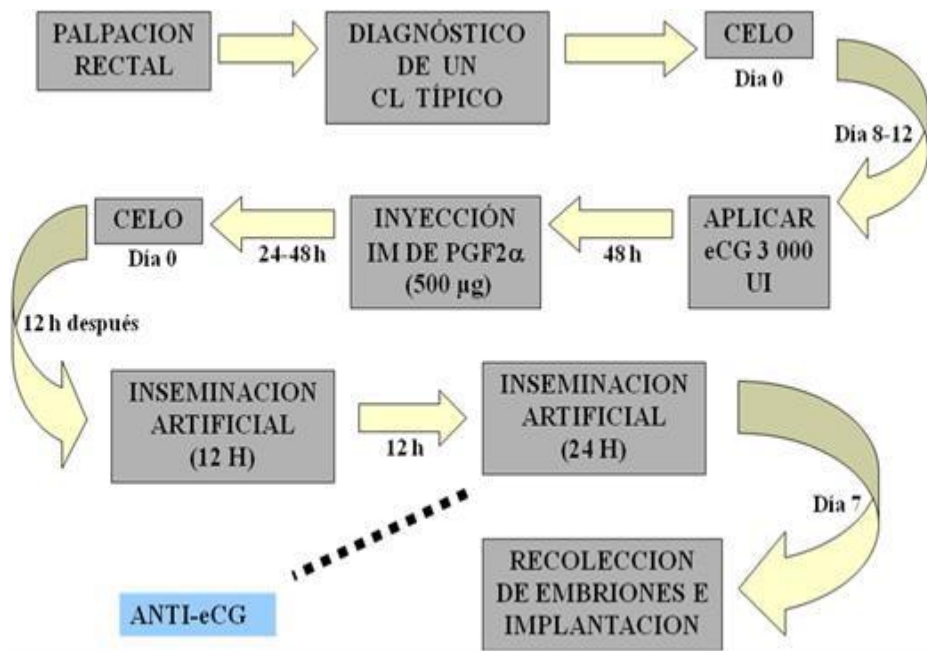
Esta característica de la PMSG, vida media larga en sangre, puede provocar el desarrollo de folículos adicionales que no alcanzan a ovular y, por estar en una etapa de desarrollo avanzada, secretan niveles altos de estrógenos que pueden afectar a los embriones en sus primeras etapas de desarrollo, obteniendo así un número mínimo de embriones para ser transferidos (**Peter et al., 1990**).

Mc Donald (1981) señala que el uso repetido de PMSG produce una reacción inmunológica secundaria indeseable ya que la PMSG es una proteína extraña que provoca reacción antígeno-anticuerpo y durante los ciclos estrales subsiguientes la respuesta ovárica a los tratamientos con PMSG es cada vez menor a medida que aumentan las concentraciones de anticuerpos, provocando una respuesta tan limitada que obliga a suspender el protocolo, además, con frecuencia se han observado reacciones anafilactoides graves con síntomas generales.

Por otro lado resultados obtenidos en laboratorio han demostrado que con la inclusión del antisuero PMSG (anti-PMSG) aplicado intramuscular (IM) coincidiendo con la segunda inyección y en dosis equivalentes a la neutralización de la mitad de la cantidad de PMSG suministrada para la

estimulación ovárica, se logran mejorar los resultados SOV, siendo posible incrementar en un embrión transferible el resultado promedio para el tratamiento con PMSG (**De Armas et al., 1996**).

FIGURA 5. ESQUEMA DE APLICACIÓN EN PROTOCOLOS DE SOV UTILIZANDO PMSG. (Adaptado de Bernal, 2007.)



2.11. Respuesta a los tratamientos SOV

La respuesta super-ovulatoria de vacas tratadas con FSH o PMSG en transferencia de embriones está supeditada a la fase de desarrollo folicular en que se inicia el tratamiento de SOV (**Fernández, 2003**).

Hincapié (2004), aduce que cuando se inicia un tratamiento superovulatorio en presencia de un folículo dominante activo, la respuesta disminuye y la

ausencia de un folículo dominante durante el inicio del tratamiento aumenta la cantidad de embriones transferibles.

Diversos estudios prueban que la respuesta superovulatoria es significativamente mayor cuando los tratamientos son iniciados el día antes o el día del comienzo de la onda folicular que los tratamientos iniciados uno o dos días después; y de esta forma, iniciando los tratamientos superovulatorios al comienzo de una onda de desarrollo folicular, antes de la selección del folículo dominante, obtendremos la mejor respuesta posible (**Bo y Mapletoft, 1999; Bo et al., 2004**).

Según **Fernández (2003)** las SOV iniciadas a partir del cuarto día de la fase de crecimiento de un folículo dominante conducen a respuestas muy pobres en lo que refiere a número de ovulaciones, debido a que el proceso de atresia de los folículos subordinados de esa onda ya está avanzado y no es posible "rescatar" muchos de estos folículos. Por el contrario, tratamientos superovulatorios comenzados simultáneamente con el inicio de una onda de desarrollo folicular conseguirán reclutar o rescatar de la atresia mayor número de folículos (Figura 6).

FIGURA 6. RESPUESTA DE LOS OVARIOS A TRATAMIENTO SOV (Foto: Bernal, 2007).



2.12. Sincronización de la Receptora

La transferencia de embriones puede efectuarse indistintamente sobre celo natural o inducido, sin embargo hay que tener en cuenta que para obtener buenos resultados de preñez, el celo de las receptoras deberá tener una sincronización no mayor a las 24 horas con el de la donante (**Rowson *et al.*, 1972**).

La donante presenta celo generalmente 48 horas post primera administración de la $Pg2\alpha$ y se efectúan dos inseminaciones artificiales (IA); la primera entre las 8-12 horas del inicio del celo y la segunda a las 12 horas después de la primera. En cada IA, se debe utilizar una dosis de semen de óptima calidad.

Cuando la donante no presenta celo, la decisión de realizar la IA dependerá de cada situación en particular teniendo en cuenta que hay donantes que

sufren un desfase en la presentación del celo, o no presentan celo o generalmente tienen una respuesta superovulatoria pobre o nula.

2.13. Sincronía Entre Receptora y Donadora

Para la transferencia de embriones con buenos resultados es necesaria la sincronización entre la etapa del huevo y del aparato reproductor de las hembras receptoras. Por lo general esto se logra seleccionando receptoras que estaban en estro en el mismo momento en el que la donadora lo estaba, ya sea naturalmente o como resultado de la sincronización del estro (**Sreenan et al., 1975**).

Varios autores (**Rowson et al., 1972; Rowson y Lawson, 1969**) demostraron que el momento de la transferencia debe ser bastante preciso en cuanto a la fase del ciclo estral ya que sus investigaciones demostraron que cuando donadoras y receptoras entraron en celo el mismo día se lograron tasas de 91 por ciento de concepción, comparado con 54, 35 y 10 por ciento, cuando había una diferencia de uno, dos o tres días, respectivamente

Para lograr estas altas tasas de concepción, es necesario observar el estro de las donadoras y las receptoras y formar un grupo en sincronía. Para ello se requiere un rebaño considerable de receptoras, de modo que haya una cantidad suficiente de estas en celo, en un momento determinado, para programar la transferencia (**Tervit, 1976**). La otra alternativa es la

sincronización, mediante progestágenos y prostaglandinas (**Tervit y Smith, 1975**) (Figuras 7 y 8).

Para ello hay que tener en cuenta que cuando se efectúa la administración de una sola dosis de $Pg2\alpha$ a hembras seleccionadas por poseer un cuerpo lúteo (CL), es necesario reservar un número mayor de receptoras por donante ya que el diagnóstico de CL por palpación transrectal tiene una eficacia que varía entre el 71 y el 96 por ciento (**Fortin, 1989**). Si consideramos que en general, el promedio de embriones transferibles por cada donante es alrededor de 5, se deben sincronizar 8 receptoras por cada donante dado que algunas deben ser descartadas antes de efectuar la transferencia por razones diversas (quistes ováricos, celos anovulatorios, imposibilidad de cateterizar la cérvix).

FIGURA 7. SINCRONIZACION DE RECEPTORAS UTILIZANDO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL BOVINO (DIB) (Foto: A. Bernal, 2007).



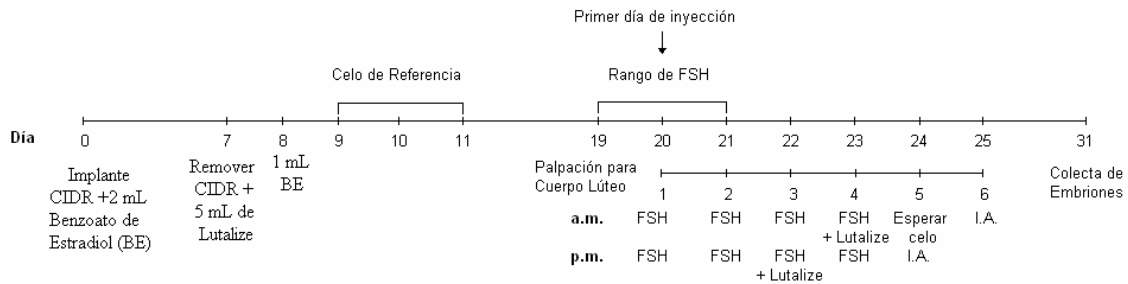
FIGURA 8 SINCRONIZACION DE RECEPTORAS UTILIZANDO DISPOSITIVO AURICULAR (Foto: A. Bernal, 2007).



2.14. Preparación e Inseminación de la Donadora

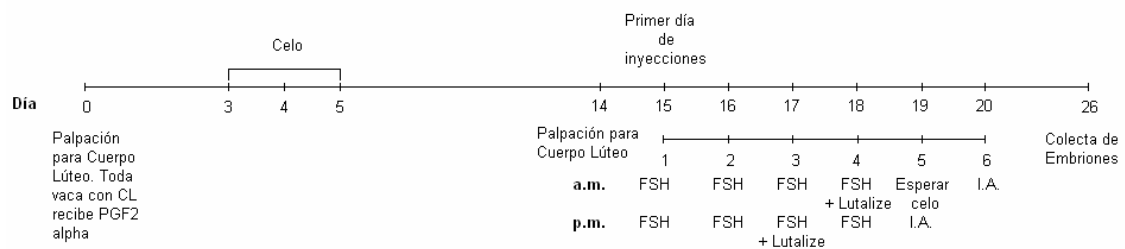
El protocolo que utiliza el celo de referencia inducido (Figura 9), consiste en seleccionar las vacas donadoras que se van a superovular sin tomar en cuenta en que fase del ciclo estral se encuentran, todas son implantadas el día cero con CIDR® o CRESTAR®, además de aplicar una dosis de dos mililitros de Benzoato de Estradiol (BE); luego el día siete se remueve el implante, el día ocho se aplica una dosis de un mililitro de BE; después se da un rango de tres días para que las vacas presenten un celo de referencia, este es inducido con el implante y las aplicaciones de Benzoato de Estradiol (BE), de aquí toma el nombre de “Protocolo con celo de referencia inducido”, durante este tiempo es importante asegurarse que las vacas demuestren que están en celo. Si lo que se quiere es únicamente preñar la vaca, se hace la I.A. entre 32 y 35 horas después de la última aplicación de BE, a esto se le conoce como Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (I.A.T.F.)

FIGURA 9. ESQUEMA DE SUPEROVULACIÓN CON IMPLANTE (CIDR®, CRESTAR®) CON CELO DE REFERENCIA (INDUCIDO) UTILIZADO EN LA EMPRESA GRI. (Fuente: Orellana y Peralta, 2007)



El protocolo de SOV con Prostaglandinas (Figura 10), utiliza el celo de referencia natural, esto es lo que lo diferencia del protocolo anterior. Es decir en este caso el celo no es inducido. El día cero se palpan las vacas donadoras, las que presentan un CL, se les aplica PGF2 α , luego entre los días tres y cinco hay un celo esperado, el cual debe ser monitoreado, vigilando de cerca el comportamiento de las vacas. Después el día 14 se hace otra palpación para CL solo en las vacas que fueron tratadas con PGF2 α , el día 15 se inicia la aplicación de FSH en las vacas que presentaron CL, se hace la IA a los días 19 y 20 y la colección de embriones al día 26. Con este protocolo se pueden ahorrar cinco días comparado con el protocolo anterior.

FIGURA 10. ESQUEMA DE SUPEROVULACIÓN (SOV) UTILIZANDO PGF2A. (Fuente: Orellana y Peralta, 2007)



2.15. Colecta de Embriones.

De Armas y Solano (1996) indican que normalmente los embriones llegan al útero después del día cinco del ciclo, por lo que, es a partir de este momento que los mismo pueden ser recolectados por las técnicas no quirúrgicas disponibles en la actualidad. Es práctica habitual realizar la recolección el día siete, pues se asegura con ello que todos los embriones o huevos hayan arribado al útero. Por otra parte se ha demostrado que los estadios de desarrollo correspondientes a este día (mórulas compactas y blastocistos) brindan altos porcentajes de preñez a la transferencia tanto en fresco como congelados. Otro aspecto que avala la elección de este día es la integridad de la zona pelúcida la cual se rompe y comienza la eclosión embrionaria ya desde el día 8.5, evento que hace al embrión más proclive a las contaminaciones con gérmenes foráneos y lo convierte en intolerante de las bajas temperaturas.

Para mejorar los resultados de la recolección se han ideado diferentes equipos que permiten un adecuado acceso al cuerno uterino y eficientes niveles de recuperación del medio empleado en el lavado del útero. La eficiencia de los mismos, tiene más que ver con la habilidad y destreza del operador en su empleo que con las facilidades técnicas de cada equipo en particular. El principio de todos los equipos y sistemas consiste en acceder hasta el segundo tercio del cuerno uterino y colocar por delante de ella el balón inflable del catéter que cerrará la luz uterina para evitar que el líquido insuflado se pierda por los orificios del catéter para su recuperación.

2.16. Clasificación de los Embriones.

Después de obtenerlos de la donadora, los huevos se aíslan con empleo de microscopio y aumento de 10X a 15X. Se utiliza una pipeta fina para cambiarlos a un medio de cultivo fresco para su examen morfológico en general con microscopio compuesto y aumentos de 40 a 200. Los embriones se deben mantener en un recipiente que evite la evaporación del medio de cultivo. A menudo se utiliza aceite mineral para cubrir el medio y evitar la evaporación así como la contaminación por microorganismos. **De Armas y Solano (1996)** dicen que una vez obtenido el lavado uterino los embriones deberán ser aislados en una pequeña porción del mismo para facilitar la búsqueda lo que se puede lograr por sedimentación o por filtrado del medio de lavado. El tiempo de sedimentación de los embriones esta en dependencia del tamaño de la columna de líquido y es aconsejable dejar en reposo el

contenedor por un espacio aproximado de 30 a 45 minutos. Antes de proceder a la decantación del sobrenadante. Por lo general, sólo se transfieren huevos normales desde el punto de vista morfológico; sin embargo, algunos de los que tienen aspecto anormal desde el punto de vista de su morfología pueden dar lugar a un producto normal (**Shea et al., 1976; Elsdén et al., 1978**).

Los huevos en cualquier etapa, desde una célula hasta blastocisto formado, puede desarrollarse a término después en su transferencia a un ambiente adecuado, pero los índices de éxito pueden ser más bajos en etapas muy tempranas y en etapas muy tardías. En la mayoría de los casos, los embriones que se encuentran entre la etapa de ocho células y la etapa de blastocisto son los que dan índices de preñez más elevados. **Stringfellow y Siedel (2000)** clasifican los embriones de acuerdo al estado (Cuadro IX). Los embriones de más edad pueden tolerar mejor su manipulación in vitro que los embriones más jóvenes. De acuerdo a su aspecto morfológico los embriones son categorizados en diferentes grados de calidad (**De Armas y Solano, 1996**).

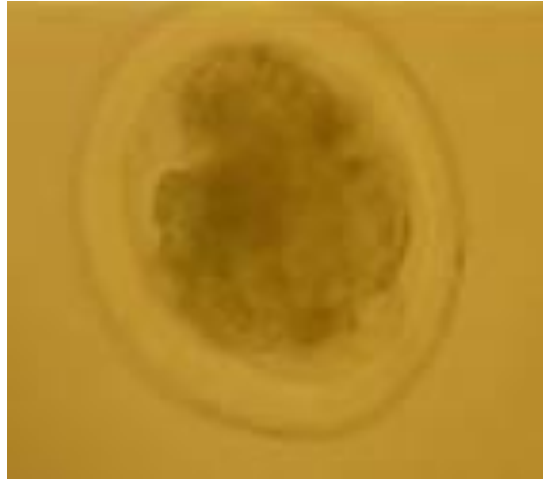
✎ Grado 1 (Excelente): Embriones considerados como normales por su respectivo estado de desarrollo que muestran los contornos celulares bien definidos y no dispersión, ni destrucción en los blastómeros (Figura 11 y 12).

✎ Grado 2 (Buenos): Embriones que tienen cambios específicos tales como: granulaciones atípicas, algunas células con signos de degeneración y opacidades anormales.

✎ Grado 3 (Pobre Calidad): Embriones que presentan muchos blastómeros dispersos (poca cohesión) y mayor grado de degeneración, ocasionalmente asimétricos, pero que todavía contienen parte de la masa celular viable.

✎ Grado 4 (Malos): Alto grado de degeneración que imposibilita determinar el estado de desarrollo.

FIGURA 11. EMBRION GRADO 1 APTO PARA SER TRANSFERIDO A UNA RECEPTORA. (Foto: De León, 2008)



De acuerdo con **Hafez (1989)** debemos desechar los embriones defectuosos que muestren cualquiera de las siguientes anomalías morfológicas (Figura 13):

- ✎ Blastómeros de tamaño variable no uniforme.
- ✎ Restos celulares en la mórula.
- ✎ Colapso de los blastocistos degenerados dentro de una zona pelúcida de forma oblonga.
- ✎ Figura mitótica desintegrada.

- ☞ Blastómeros de aspecto espumoso que no se pueden distinguir.
- ☞ Fragmentación del material citoplasmático y nuclear.
- ☞ Morfología anormal de la mórula o del blastocisto

FIGURA 12. EMBRION CON RUPTURA DE LA ZONA PELUCIDA, PERO APTO PARA SER TRANFERIDO (Foto: De León, 2008).

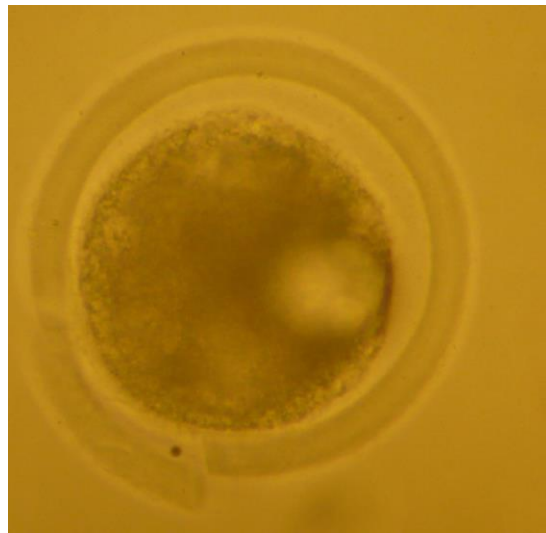
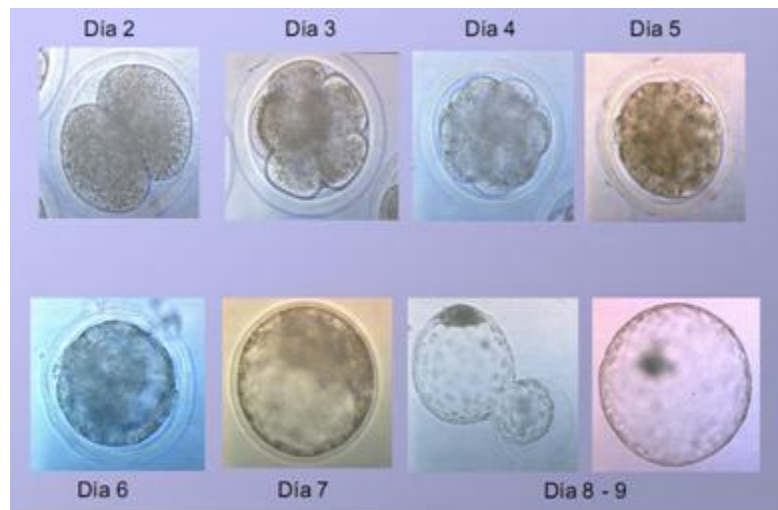


FIGURA 13. DESARROLLO EMBRIONARIO. (Fuente: Córdoba, 1996)



CUADRO IX. CLASIFICACION DE LOS EMBRIONES DE ACUERDO AL ESTADO.

N°	ESTADO
1	<i>No fecundado</i> : si el embrión se recoge en el día 7 o en posteriores y el estado no coincide con el esperando, debe clasificarse con un código de categoría inferior o simplemente es el resultado de un ovocito no fecundado.
2	<i>2 a 12 células</i> : células de gran tamaño que se presentan fuera de la masa embrionaria ante del estado de 16 células, fácilmente supondrán más del 15% del total de la masa celular en el estado de desarrollo 5.
3	<i>Mórula temprana</i> : la presencia de blastómeros de gran tamaño indica que la compactación no se ha completado y se encuentra en el estadio temprano de desarrollo 4.
4	<i>Mórula</i> : a los embriones con muchas células o detritos fuera de la masa celular se les debe girar cuidadosamente para determinar la calidad y viabilidad de la masa muscular.
5	<i>Blastocisto temprano</i> : tiene una masa embrionaria menor del 50% del total del material celular presente dentro de la zona pelúcida.
6	<i>blastocisto</i> : la presencia de formas irregulares es un fenómeno común durante el desarrollo
7	<i>Blastocisto expandido</i> : se presenta fuera de la masa celular y suponen menos del 15% del total del embrión y el embrión se encuentra en el estado de desarrollo esperado
8	<i>Blastocisto eclosionado</i> : que el blastocisto se contraiga después de la expansión se considera que es un proceso normal y no afecta a la calidad del embrión
9	<i>Blastocisto eclosionado expandido</i> : tiene célula en contacto con la zona pelúcida fuera de la masa celular del embrión.

Fuente: Stringfellow y Siedel, 2000

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización del Ensayo.

El estudio se llevo a cabo en las instalaciones de la Estación Experimental del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, Carlos M. Ortega, localizada en Gualaca a 70 metros sobre el nivel del mar, entre los 8°39'20'' de latitud norte y los 82°10'10'' de longitud oeste, específicamente en la unidad vaca ternero.

Esta zona se caracteriza por tener un clima de bosque húmedo tropical premontano (BHTPM) con temperatura media anual de 26 grados centígrados, precipitación anual promedio de 3,500 milímetros y humedad relativa de 80 por ciento. Los suelos son franco arcilloso, latosólico; color rojo de origen mixto basáltico y andesítico. Posee buena estructura y drenaje; pH de 5.0 a 5.2; materia orgánica de cinco por ciento; contenido de fósforo de dos partes por millón y potasio de 36 a 40 partes por millón.

3.2. Animales Experimentales.

Para esta investigación se utilizaron 24 hembras multíparas de la raza brahmán pertenecientes al grupo elite (donadoras de embriones) de la Estación Experimental de Gualaca con edades entre los 36 y 60 meses de edad y peso promedio de 450 kilogramos (Figura 14).

Una vez seleccionadas las hembras, fueron divididas completamente al azar en seis grupos de cuatro animales cada uno a los que se les aplicaron los tratamientos en estudio.

FIGURA 14. VACA BRAHMAN ELITE DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE GUALACA SELECCIONADA COMO DONADORA.



3.3. Manejo de los Animales.

Área y tipo de pastura: Las hembras seleccionadas para el ensayo se mantuvieron pastoreando en praderas de *Brachiaria humidicola*, las cuales recibieron una fertilización con 80, 50 y 30 kilogramos de N, P₂O₅ y K₂O respectivamente (**Pinzón, 2000**) manejadas bajo un sistema de rotación de siete días de ocupación por 21 días de descanso.

Todas las hembras recibieron una suplementación energético-proteica en base a sus requerimientos nutricionales (**NRC, 1984**). También se les ofreció una mezcla mineral ad libitum de acuerdo a los principales minerales requeridos en la fase final de gestación.

3.4. Manejo Sanitario.

El control de endo y ecto parásitos se realizó utilizando tratamientos de Ivermectina y Albendazole alternados, mientras que para controlar la mosca pailetera se realizaron baños de aspersion cada 30 días con rotación de los productos químicos.

3.5. Tratamientos.

Se utilizaron dos tipos de hormonas estimulantes del crecimiento y desarrollo folicular. Suero de yegua preñada (PMSG, Folligon®, Intervet, Francia) y Hormona Folículo Estimulante (FSH, Folltropin®-V, Bioniche, Canadá), las cuales se emplearon según dosificación recomendada. Las dosificaciones evaluadas fueron (Cuadro X):

Dosis Alta:

1. PMSG 2500 UI + hCG 1250 UI
2. FSH 31.25 mg (10 cc.)

Dosis Media:

3. PMSG 2000 UI + hCG 1000 UI
4. FSH 25 mg (7.5 cc)

Dosis Baja:

5. PMSG 1500 UI + hCG 750 UI
6. FSH 8.8 mg (6.5 cc)

CUADRO X. DISTRIBUCION DE LOS TRATAMIENTOS.

	TIPO DE HORMONA					
	PMSG			FSH		
	1500 UI	2000 UI	2500 UI	18.8 mg	25 mg	31.25 mg
DOSIS ALTA			+			+
DOSIS MEDIA		+			+	
DOSIS BAJA	+			+		

3.6. Metodología.

Como criterio de selección de los animales experimentales se utilizó, además de la condición corporal y el valor genético, el estado reproductivo de la hembra donante. Para ello se realizó la palpación transrectal con el propósito de determinar el tamaño de los ovarios y si estaban ciclando.

Una vez examinadas las vacas, aquellas que no presentaron ninguna anomalía, fueron seleccionadas y se les aplicó dos mililitros de Cloprostenol® (un análogo de $Pg2\alpha$) por vía intramuscular profunda con el propósito de sincronizar una nueva onda folicular. Aquellas vacas que presentaron celo entre las 48 y 72 horas de aplicada la hormona, se separaron de las que no lo presentaron y se programaron para iniciar los tratamientos de SOV.

Diez días después de haber sincronizado la onda folicular, los grupos de donadoras fueron tratadas con FSH y PMSG, de acuerdo a los tratamientos descritos con el propósito de provocarles una SOV

3.6.1. Metodología para el Tratamiento SOV con FSH

El protocolo de SOV con FSH aplicado (Figura 15), fue el descrito por Bernal (2007), que consiste en aplicar ocho inyecciones intramuscular profunda (IMP), al inicio de la fase media luteal (entre los días 8-12 previo diagnóstico de un CL típico), de FSH comenzando temprano en la mañana, con intervalos de 12 horas (6:00 y 18:00 horas) durante 4 días en dosis descendente o ascendente, según sea el caso.

Con la aplicación de la quinta dosis de FSH (72 horas de iniciado el tratamiento) se suministran 500 microgramos de PGF2 α , apareciendo el estro 48 horas después. La inseminación artificial se realiza a las 60 y 72 horas post aplicación de la PGF2 α .

En nuestro estudio, la FSH se aplicó de acuerdo al protocolo descrito y las dosis fueron aplicadas en las dos formas: ascendente o descendente (dos donadoras por cada tratamiento) durante cuatro días, tanto en la mañana como en la tarde, con intervalos de 12 horas exactas entre cada aplicación.

Al tercer día, se aplicaron dos mililitros del sincronizador de celo Cloprostenol® (análogo de PGF2 α) a las vacas tratadas y el celo se detectó entre las 48 ó 72 horas después de aplicado el sincronizador. La inseminación artificial se realizó a las 12 y 24 horas de detectado el celo con pajuelas comerciales de 0.5 mililitros de toros de alto valor genético.

FIGURA 15. PRESENTACION COMERCIAL DE LA FSH.



3.6.2. Metodología para el Tratamiento SOV con PMSG.

Al igual que en el protocolo anterior, la aplicación de la PMSG se aplicó diez días después de haberse sincronizado la nueva onda folicular (Figura 16). Esta hormona se aplicó en dosis única el primer día. La dosis aplicada varió de acuerdo a los tratamientos (Cuadro X).

Setenta y dos horas después se aplicaron dos mililitros de Cloprostenol® (análogo de $PGF_{2\alpha}$) a las vacas tratadas y a posteriormente a las 48 ó 72 horas después de aplicado el sincronizador se observó el celo. La inseminación artificial se realizó a las 12 horas y 24 de haber detectado el celo con pajuelas de semen comercial de 0.5 mililitros de toros de alto valor genético. Al momento de la segunda inseminación se aplicaron cinco mililitros de hormona coriónica humana (hCG) para provocar la ruptura de los folículos.

FIGURA 16. PRESENTACION COMERCIAL DE LA PMSG.



3.7. Diagnósticos.

Los diagnósticos para la determinación del tamaño de los cuerpos lúteos (CL) y presencia de folículos (FOL) se realizó a los siete días post inseminación mediante el uso de un ultrasonido (SONOVET 2000). Identificada la cantidad de CL se procedió a realizar el lavado de las donadoras.

3.8. Lavado de Donadoras.

El lavado se realizó a los siete días post inseminación utilizando como solución de lavado Lactato de Ringer (CORPAUL, Medellín, Colombia) a razón de 1000 mililitros por cada vaca donadora (500 mililitros por cada cuerno lavado).

3.9. Búsqueda y Clasificación de Embriones.

La evaluación visual de los embriones no es una ciencia exacta sino que es una técnica subjetiva utilizada para evaluar un sistema biológico. El criterio

para asignar un código de calidad en formulario estandarizado, se ha simplificado para que su uso sea sencillo.

Para la evaluación de los blastocitos expandido se tomó en cuenta su eclosión, la formación y la expansión del mismo, bajo los siguientes criterios **(Lindner y Wright, 1983)**. Estos aspectos tienen que ver con la calidad de los embriones:

3.9.1. Los Trasferibles:

- ✎ Excelente: Embriones simétrico con diferenciación notoria del Macizo Celular Interno (MCI) y del blastócele.
- ✎ Bueno: Embrión simétrico con diferenciación del MCI y del blastócele.
- ✎ Regular: Embrión simétrico o levemente asimétrico con diferenciación del MCI y del blastócele
- ✎ Malo: Embrión asimétrico sin diferenciación del MCI y del blastócele.

3.9.2. Los No Trasferibles:

- ✎ Retrasados.
- ✎ Degenerados.

El código para la calidad del embrión es numérico y se basa en la integridad morfológica del embrión. Los códigos para el rango de calidad del embrión van de uno a cuatro como sigue:

- ✎ Código 1: La zona pelúcida debe ser lisa y no debe tener ninguna superficie cóncava o delgada que podría causar que el embrión se adhiera a la placa de cultivo o la pajueta
- ✎ Código 2: Presenta irregularidades moderadas en la forma global de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de la célula individuales.
- ✎ Código 3: Presenta irregularidades mayores en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de la célula individuales.
- ✎ Código 4: Embriones degenerados, ovocitos o embriones de 1 célula: no valida

Con base a estos criterios, los embriones recuperados fueron clasificados y se les determino su estadio de desarrollo, su transferibilidad y su calidad.

3.10. Variables de Respuesta.

Como variables de respuesta se consideraron las siguientes:

- ✎ Número de folículos No Ovulados: Este se realizó por medio de ultrasonografía rectal.
- ✎ Número de cuerpos lúteos: Este fue determinado por ultrasonografía y por medio de la palpación transrectal.
- ✎ Producción de embriones: Una vez colectado el lavado uterino, se transportaba al laboratorio y se precedía a la búsqueda de embriones por medio de un estereoscopio.

- ✎ Calidad embrionaria: Una vez colectados los embriones se evaluaron de acuerdo al criterio señalado por **Stringfellow y Siedel**, (2000) teniendo como referencia las ilustraciones del Manual de Transferencia de Embriones de la International Embryo Transfer Society (**IETS**, 2000).

3.11. Análisis Estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) el cual se representa con el siguiente modelo matemático (**Steel y Torrie**, 1980):

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_j(\tau_i) + \delta_k$$

Donde:

Y_{ijk} = k-ésima observación de la i-ésima hormona experimental, del i-ésimo grupo racial.

μ = media general.

τ_i = efecto de La i-ésima hormona.

$\alpha_j(\tau_i)$ =efecto de la variación del nivel hormonal dentro del tipo de Hormona.

δ_k = error experimental

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la investigación se detallan a continuación

4.1. Número de Folículos no Ovulados por Hormona y por Dosis.

El análisis estadístico (Cuadro XI) mostró efectos altamente significativos ($P < 0.01$) para tipo de hormona y dosis con respecto a la variable folículos no ovulados (Figura 17). De igual manera se encontró diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) para las dosis dentro del tipo de hormona lo que nos indica una alta dependencia entre el tipo de hormona y la dosis que se aplica.

CUADRO XI. ANOVA PARA NÚMERO DE FOLICULOS NO OVULADOS POR DOSIS.

FUENTE DE VARIACION	GL	ANOVA	CUADRADO MEDIO	F-Valor	Pr>F
HORMONA	1	422.87	422.87	7.46	0.0122*
DOSIS	5	903.83	180.76	4.20	0.0100*
HORMONA(DOSIS)	5	903.83	180.76	4.25	0.0100*
ERROR	23	765.50	42.52		

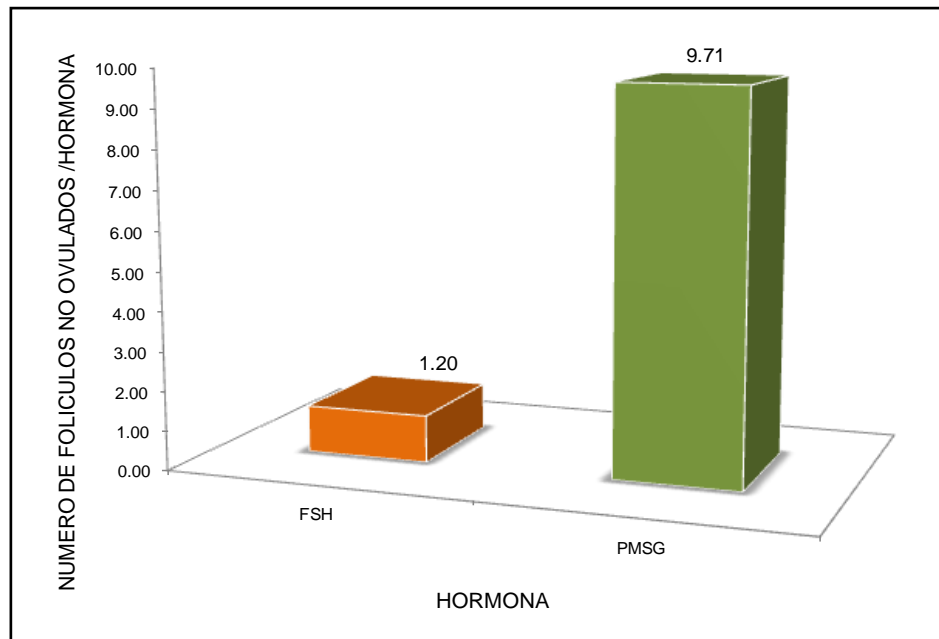
$R^2 = 0.253320$

CV= 122.61%

Media= 6.16

Estos resultados concuerdan de los obtenidos por **Halleg et al. (1981)**, quienes al superovular 122 vacas brahmán con dosis de FSH entre 36 y 48 miligramos más 40 miligramos de prostaglandina encontraron efectos significativos entre de las dosis de hormonas utilizadas.

FIGURA 17. MEDIA DE LOS FOLICULOS NO OVULADOS POR TIPO DE HORMONA.



Estos resultados indican que la respuesta a los tratamientos SOV pueden variar de acuerdo a la hormona y a la dosis que se aplique (Figura 18). En nuestro caso, con dosis altas y bajas de FSH al igual que dosis altas de PMSG se lograron los mejores resultados en cuanto a número de folículos no ovulados, observándose que dosis medias y bajas de PMSG, dieron como resultado muchos folículos observados no ovulados (Figura 19) coincidiendo con los resultados obtenidos por **Willet *et al.* (1952)** quienes señalan que si la dosis de PMSG es demasiado alta, los resultados serán muchos folículos sin

ovular. Por otra parte, **Langer (1960)** plantea que los tratamientos con PMSG ofrecen mejores resultados en animales jóvenes donde el celo y la ovulación se presentan entre los dos y seis días después de la aplicación de PMSG, teniendo que emplear en animales más viejos una dosis más alta. De igual forma, **Hafez et al. (1963)** aseguran que una aplicación alta de una dosis de PMSG (5000 UI) produce que la mayoría de los folículos sean hemorrágicos, esto ha sido confirmado por **Schaltz (1965)**, pero no ocurrió en nuestra investigación. En cuanto al tamaño de los folículos no ovulados, el mismo vario entre los nueve y veinte milímetros de diámetro.

FIGURA 18. NUMERO DE FOLICULOS NO OVULADOS POR DOSIS DE HORMONA.

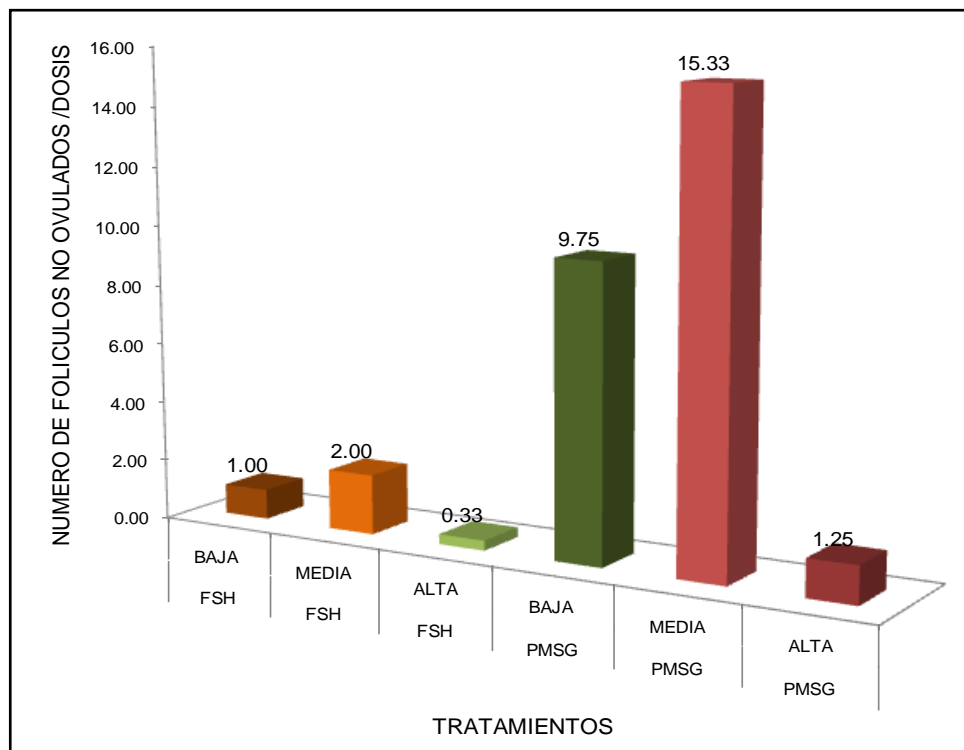


FIGURA 19. FOLICULOS NO OVULADOS OBSERVADOS A TRAVÉS DEL ECOGRAFO.



Al comparar el efecto del tipo de hormona sobre la presencia de folículos no ovulados (Figura 17) se puede observar que cuando se aplicó la hormona PMSG el número fue mayor (9.71 ± 9.73) que cuando se aplicó la hormona FSH (2.60 ± 2.98). Estos resultados concuerdan con los de **Elsden et al. (1978)** quienes indican que la FSH induce una respuesta superovulatoria más uniforme y preferible que la lograda con PMSG.

Similares resultados reporta **De Armas (1992)** que señala que dentro de las alternativas, la utilización de la hormona PMSG a razón de 2500-3000 unidades internacionales en vacas, es una de las opciones más viable para la producción de embriones. Nuestros resultados también concuerdan con los reportados por **Duch (1986)**, quien señala que la PMSG en dosis muy altas

se hace persistente su nivel de concentración en la sangre, por lo cual su utilización debe ser acompañada por alguna otra hormona que inhiba su efecto o anti-PMSG para que no produzca un efecto negativo sobre el animal, repercutiendo sobre la calidad embrionaria. En este mismo sentido, resultados obtenidos por **Bernal (2007)**, han mostrado que la inclusión del anti-suero PMSG (anti-PMSG) aplicado vía intramuscular (IM) en coincidencia con la segunda inseminación en dosis equivalente a la neutralización de la mitad de la cantidad de PMSG suministrada para la estimulación ovárica, se logran mejorar los resultados superovulatorios, así es posible incrementar en un embrión transferible el resultado promedio descrito para el tratamiento con PMSG

Por otro lado, trabajos realizados por **Moore (1975)** señalan que se ha demostrado que el intervalo entre el tratamiento de PMSG y el estro influye sobre la proporción de folículos que maduran y posteriormente ovulan, observando que los intervalos prolongados dan un mayor número de folículos que no ovulan, lo que podría explicar nuestros resultados del porque no todos los folículos observados ovularon.

Es muy importante considerar que la respuesta superovulatoria de vacas tratadas con FSH o PMSG está sujeta a la fase de desarrollo folicular en que se inicia el tratamiento de superovulación (**Fernández, 2003**). En este estudio, la mayor cantidad de folículos no ovulados puede ser explicada, tal como indica **Fernández (2003)** debido a que las SOV iniciadas a partir del cuarto

día de la fase de crecimiento de un folículo dominante conducen a respuestas muy pobres en lo que refiere a número de ovulaciones, debido a que el proceso de atresia de los folículos subordinados de esa onda ya está avanzado y no es posible rescatar ya muchos de esos folículos.

Por otro lado, varios trabajos publicados han demostrado la existencia de baja tasa ovulatoria en bovinos cuando el tratamiento SOV se inicia con la presencia de un folículo dominante (**Grasso et al., 1989; Guilbault et al., 1991; Huhtinen et al., 1992**), aún durante la fase de selección de crecimiento de este folículo dominante (**Adams et al., 1992b**) aspecto este que no fue considerado en la investigación. Esto fue demostrado por **Bungartz y Niemann (1994)**, quienes encontraron una baja respuesta a la SOV en los animales tratados en presencia de un folículo dominante cuando se compararon con animales sin el folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio, mediante exámenes ultrasonográficos diarios.

4.2. Número de Cuerpos Lúteos por Tratamientos.

Al evaluar mediante ultrasonografía y palpación transrectal el efecto de la aplicación de PMSG y FSH en dosis baja, media y alta sobre la presencia de cuerpos lúteos, los resultados mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) para el tipo de hormona, sin embargo no se encontraron diferencias significativas para la dosis ni para dosis dentro de hormonas, lo que sugiere que hay una

independencia de las dosis sobre la presencia de cuerpos lúteos, (Cuadro XII) la independencia de estas variables.

CUADRO XII. ANOVA PARA NÚMERO DE CUERPOS LUTEOS POR TRATAMIENTO.

FUENTE DE VARIACION	GL	ANOVA	CUADRADO MEDIO	F-Valor	Pr>F
HORMONA	1	97.37	97.37	1.38	0.0206*
DOSIS	5	122.50	122.50	1.38	0.2778
HORMONA(DOSIS)	5	122.50	122.50	1.38	0.2778
ERROR	23	319.33			

$R^2 = 0.22$

CV = 89.59%

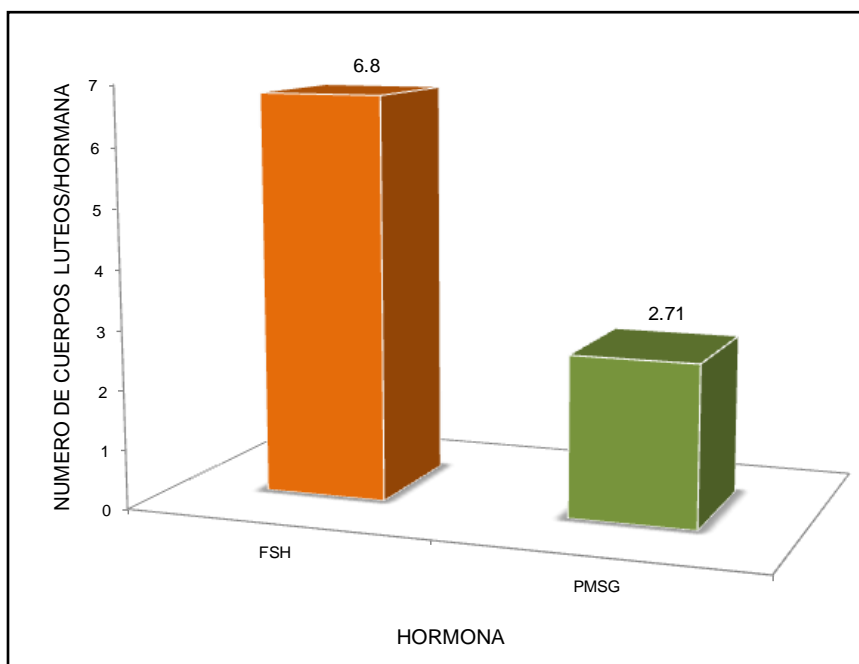
Media= 4.42

Cuando comparamos el efecto del tipo de hormona sobre la presencia de cuerpos lúteos (CL) (Figura 20.), observamos que con la FSH obtenemos un mayor número de CL (6.8 ± 2.78) que cuando se aplica PMSG (2.71 ± 4.59), esto como resultado de un mayor número de folículos ovulados que se lograron con la aplicación de la FSH. Esto lo explica **Elsden et al. (1978)** al indicar que con esta hormona se obtienen resultados más uniformes.

Cuando revisamos la literatura, comprobamos que nuestros resultados difieren de los obtenidos por **Bernal (2007)** y **Bravo (2000)**, quienes reportaron que, en vacas Siboney, un tratamiento a base de PMSG y PGF2 complementado con anti-PMSG, por vía IM al momento del segundo servicio de IA, se observó una media de cuerpos lúteos entre 6.4 ± 4.2 y 7.2 ± 6.0 ,

respectivamente. Esta diferencia de resultados con los nuestros puede estar relacionada al hecho de que en nuestro estudio no se aplicó la anti-PMSG, lo cual mejora la respuesta superovulatoria cuando se aplica.

FIGURA 20. NUMERO DE CUERPOS LUTEOS POR HORMONA.



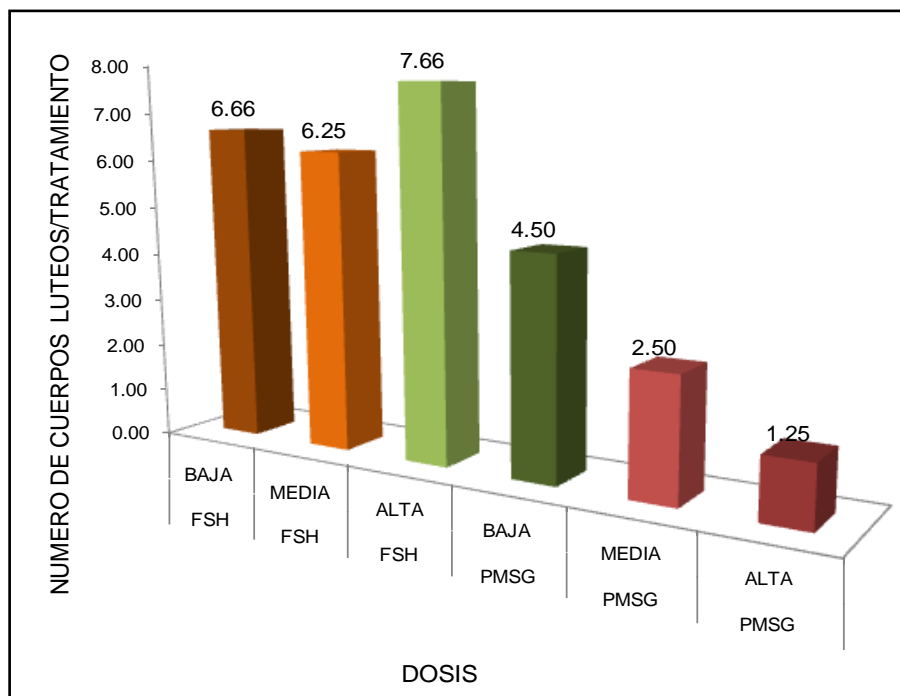
La baja respuesta obtenida en esta investigación, donde utilizamos vacas cebuínas, coincide con lo reportado por **Bernal (2008)**, que señala que la respuesta a la utilización de PMSG, es menor en animales cebuínos, comparados con animales cruzados de la raza Siboney.

Este efecto se debe a que la PMSG es una proteína extraña al organismo y a diferencia de las razas europeas y sus cruces, las razas cebuínas tienden a

producir un mayor número de anticuerpos disminuyendo la respuesta ovárica siendo cada vez menor a medida que aumentan las concentraciones de anticuerpos (**Mc Donald, 1981**). Por lo tanto esta hormona puede provocar un desarrollo de folículos adicionales que no alcanzan a ovular por su vida media larga en sangre (**Petr et al., 1990**).

En cuanto al número de CL por tratamiento hormonal (Figura 21) se pudo observar que las respuestas más estables se lograron cuando se aplicó FSH, encontrándose respuestas variables con la PMSG.

FIGURA 21 **NUMERO DE CUERPOS LUTEOS POR TRATAMIENTO HORMONAL.**



4.3. Producción de Embriones por Tratamiento.

El análisis de varianza (Cuadro XIII) para la producción de embriones reflejó diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) para hormona, dosis y dosis dentro de hormona para la producción de embriones.

Las mayores cantidades de embriones se lograron con la aplicación de FSH en dosis medias y bajas (3.50 ± 2.88 y 4.00 ± 3.30 embriones respectivamente) que utilizando la PMSG en donde los mejores resultados se lograron con dosis bajas (0.25 ± 0.50) (Figura 22), coincidiendo nuestros resultados con los estudios realizados por **Calva et al. (2001)** quienes obtuvieron resultados satisfactorios con el uso de la FSH.

CUADRO XIII. ANOVA PARA PRODUCCION DE EMBRIONES POR TRATAMIENTO.

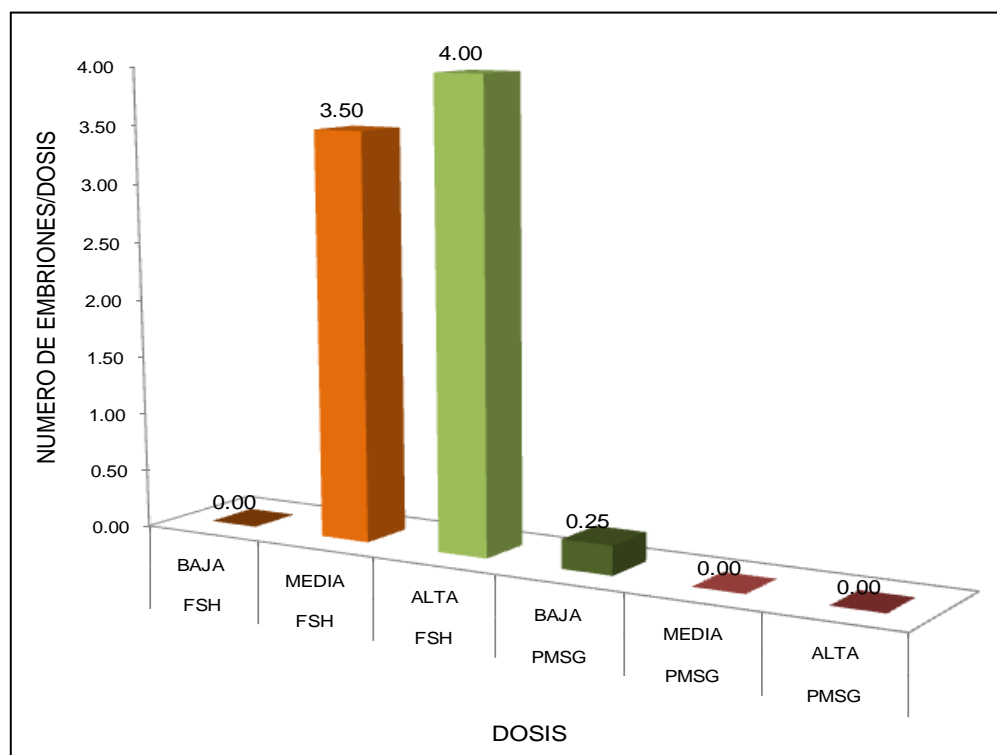
FUENTE DE VARIACION	GL	ANOVA	CUADRADO MEDIO	F-Valor	Pr>F
HORMONA	1	37.29	37.29	10.09	0.0044**
DOSIS	5	66.87	13.37	4.65	0.0067**
HORMONA(DOSIS)	5	66.87	13.37	4.65	0.0067**
ERROR	23	51.75	2.87		

$R^2 = 0.31$

CV= 170.90%

Media= 1.13

FIGURA 22. NUMERO DE EMBRIONES POR DOSIS DE HORMONA.

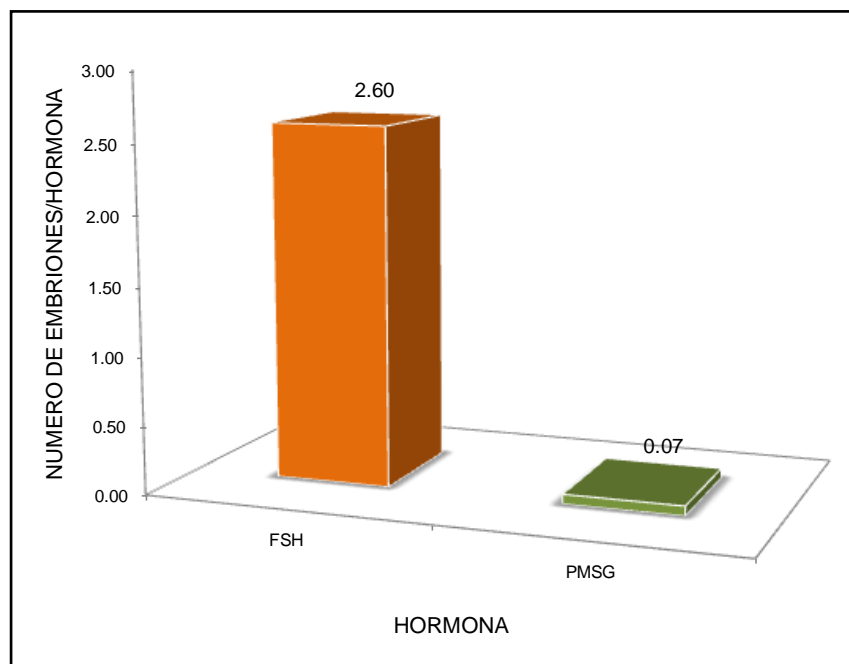


Los resultados obtenidos con la hormona FSH concuerdan con los trabajos realizados en el IDIAP por **González y De León (2008)**, que han reportado una respuesta promedio de 7.6 embriones totales por superovulación, de los cuales 6.33 embriones transferibles.

En nuestro estudio, cuando utilizamos la hormona FSH logramos no solo la mayor cantidad de embriones, sino la mejor calidad (Figura 23), pero es importante señalar que el uso de esta hormona resulta ser un arma de doble filo ya que por su corta duración en la sangre es necesario aplicarla en intervalos de 12 horas, lo cual causa estrés en el animal por la constante manipulación y pudiera afectar la respuesta.

También coinciden nuestros resultados con los publicados por otros autores **Díaz et al. (1999)** y **De Ruigh et al. (1995)**, quienes observaron que en animales en los que se inició el tratamiento de FSH el día 12, tanto la respuesta superovulatoria como el número total de embriones recogidos y el número de embriones transferibles fueron significativamente superiores que los resultados obtenidos en los animales tratados con PMSG. Concordamos también con lo señalado por **De Armas et al. (1996)** cuando indican que la utilización de la hormona FSH brinda resultados más estables al ser comparada con la PMSG ya que es más eficiente en animales con sangre cebuína.

FIGURA 23. NUMERO DE EMBRIONES POR TIPO DE HORMONA.



4.4. Estadios y Calidad Embrionaria por Tratamiento.

La media para embriones recuperados fue de 1.12 aunque los mejores los promedios se lograron con las dosis medias y altas de FSH (3.50 ± 2.88 y 4.00 ± 3.60 respectivamente). Estos embriones fueron clasificados en estadios de mórulas y mórulas tempranas.

La clasificación se hizo de acuerdo a las características descritas por **Stringfellow y Siedel (2000)** en el Manual de transferencia de Embriones de la IETS (International Embryo Transfer Society) categorizándose como de calidad 1 y 2 aptos para ser transferidos.

5. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir lo siguiente:

1. La Hormona Folículo Estimulante (FSH) ofreció mejor respuesta al tratamiento superovulatorio que el Suero de Yegua Preñada (PMSG).
2. El tipo de hormona influye en el número de cuerpos lúteos.
3. El tipo de hormona tiene un efecto sobre el número de embriones recuperados.

6. RECOMENDACIONES

En los programas de transferencia de embriones no sólo es importante que el número embriones transferibles sea alto, sino que también respondan la mayor parte de los animales tratados. Por lo tanto, la monitorización del folículo dominante y el control del inicio de su atresia o la inducción de su rotura en el momento de comenzar el tratamiento superovulatorio, a través de la ultrasonografía pueden permitir un incremento importante en el número de embriones transferibles obtenidos.

Por lo anteriormente expuesto, recomendamos que antes de iniciar los tratamientos SOV, independientemente de la hormona, se verifique la presencia o no de folículos dominantes que puedan afectar las respuestas de las donadoras y reducir el número de embriones colectados.

Por la gran cantidad de folículos no ovulados al utilizar la PMSG, recomendamos aumentar la dosis de hCG que neutralicen la totalidad de la dosis de PMSG y mejore la respuesta al tratamiento.

7. REVISION DE LITERATURA

Adams, G.P.; Matteri, R.L.; Kastelic, J.P.; Ko, J.C.H.; Ginther, O.J. 1992. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.94, pp.177-88.

Alvarado, E. 2006. Publicación selección, manejo y sincronización de receptoras (en línea). Facultad de Zootecnia – UNALM Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (CIETE). Consultado 11 julio 2008. Disponible en:

Amir, P.; Kinkscheers, H.C. 1989. Conducting on-farm animal research: Procedures and economic analysis. Winkrock International Institute for Agricultural Development. USA. International Development Research Center. Canada. 244 p.

Anta, E.; Rivera, J. A.; Galina, C.; Porras, A.; Zarco L. 1989. Análisis de la información publicada en México sobre la eficiencia reproductiva de los bovinos. II Parámetros reproductivos. *Vet. Méx.* 20: 11-18.

Association OF Official Analytical Chemists. 1965. Official methods of analysis. AOAC. Arlington, Virginia. USA. 372p.

Ávila, A. 2007. Transferencia de embriones en ganado bovino (en línea). Consultado 22 Ago. 2008. Disponible en:

Bartmann, C.P. 1992. Untersuchungen zur verbesserung der supereovulation sergebnisse beim rind durch et fernung des dominanten follikels am eierstock mit hilfe der sonographie. *Vet. Med. Dissertation.* Hannover.

Baruselli y col (2005). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2006 Jan 7; 65 (1):77-88. Epub 2005 Nov 14. Review. PMID: 16290257 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Basurto, Ch. 1997. Sincronización del estro en bovinos en el trópico Mexicano. *Memorias avances de farmacología aplicada en la clínica bovina.* México, D.F. México. pp. 131-142.

Beal, WE, Chenault JR, Day, ML, Corah, LR. 1988. Variation in conception rates following synchronization of estrus with melengestrol acetate and prostaglandin F₂α. *J. Anim. Sci.* 66: 599-602.

Bernal, A. 2007. Técnicas de súper Ovulación para Ganado bovino. En curso de biotecnología. CIMA, Cuba.

Bo GA, Adams GP, Pierson RA , Mapletoft RJ. 1996. Effect of progestogen plus estradiol-17 beta treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology* 1996; 45 (5): 897-910.

Bo, G. 1998. Actualización del ciclo estral bovino.IV Jornadas Nacionales CABIA y I del Mercosur, 1998.

Bo, G.A.; Mapletof, R.J. 1999. Control del desarrollo folicular y su aplicación en programas de superovulación de donantes de embriones (en línea). Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Agronomía Córdoba, Argentina. Consultado el 23 de Octubre 2009. Disponible en:

Bungartz, L.; Niemann, H. 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.101, pp.583-91

Calva, B.; Cortés, R.; Aja, S.; Ortíz, F.; Cevenini, G. 2001. La transferencia de embriones. Una técnica de mejoramiento animal ganado de lidia. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia. Órgano de difusión científica de la academia mexicana de cirugía.

Carvalho JBP. Sincronizacao da ovulacao com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) em novilhas *B. indicus*, *B. indicus* _ *B. taurus* e *B. taurus*. 2004. PhD Thesis, São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.

Chenoweth PJ. Influence of the male on embryo quality. *Theriogenology*, 2007; 68 (3): 308-315.

Cunningham, JG (1997) "Fisiología veterinaria" Segunda Edición. Edición Interamericana McGraw-Hill

Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftsinger M, Saacke RG. 2000. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J Anim Sci* 2000; 78 (8): 2081-2085.

De Armas, R. 1999. Posibilidades Prácticas de la Técnica de Transferencia de Embriones. Programa de Transferencia de embriones FAO- Min. Agric. Perú. Moyobamba, Perú.

De Armas, R; Solano, R. 1995. Manual Práctico de Transferencia de Embriones y Fertilización In Vitro. Ed. CIMA., La Habana, Cuba.

De La Sota, R L; Soto, A T; Gobello, M C 2002. Farmacología del estro y del parto Cap. 32 pp 423-434 En: Botana Lopez, L M; Landoni, M F; Martinjimenez, T " Farmacología y terapéutica veterinaria" Primera Edición. Ed. Mc Graw Hill. Interamericana.

De León G, R.H y González M, R.A.. 2008. Producción de embriones in vitro a partir de ovarios postmortem. Proyecto de Mejoramiento Genético y Biotecnología. Panamá, PA, IDIAP.

De León G, R.H y González M, R.A.. 2010. Manual Técnico de Fertilización in vitro. Panamá, PA, IDIAP

De Ruigh, L.; Pearson R.E.; Van Wagtendonsk-De Leeuw, J.A.M. 1995. Are permanent donor cows permanent donor cows?. 11e Colloque scientifique. Association Europeenne de Tranfert Embryonnaire, Hannover, 8 et 9 septembre 1995, pp: 158.

Derivaux, J; Ectors, F. 1984. Fisiopatología de la gestación y obstetricia veterinaria. Editorial Acribia. España. 175 p.

Díaz, C.; Quintela, L.A.; Peña, A.I.; Becerra, J.J.; Herradón, P.G. 1999. Influence of the day of the beginning the treatment in the results of superovulation in dairy cattle. Área de Reproducción y Obstetricia. Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria de Lugo. 27002 Lugo. España. Archivos de zootecnia vol. 48, núm. 181, p. 50.

Díaz, E. 1998. Factores que afectan el funcionamiento pospartum de la hembra bovina y su importancia zootécnica para el éxito de la empresa ganadera. Seminario. Facultad de Ciencias Agropecuaria, Universidad de Panamá. Pp. 9-10.

Donaldson, L. 1984a. The day of the estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. Theriogenology 22: 97-99.

Echeverría, J. (2005a) "Aspectos farmacológicos en el control del ciclo estral de la perra. Revisión bibliográfica" REDVET.

Echeverría, J. 2004a "Endocrinología Reproductiva: Oxitocina. Revisión bibliográfica" Boletín técnico elaborado para Laboratorio Chem Stolz S.R.L..

Echeverría, J. 2004b "Endocrinología Reproductiva: Hormona liberadora de gonadotropinas (Gn-RH). Revisión bibliográfica" Boletín técnico elaborado para Laboratorio Biogénesis S.A.

Echeverría, J. 2005b "Endocrinología Reproductiva: Benzoato de estradiol. Revisión bibliográfica" Boletín técnico elaborado para Laboratorio Biogénesis S.A.

Elsden , R.P.; Hasler, J.F.; Seidel, G.E. Jr. 1976. Non- surgical recovery of bovine eggs. *Theriongenology* 6, 523.

Elsden, R., Nelson, L., Seidel, G. 1978. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriongenology*, 9: 17-26.

Elsden, R.P; Nelson, L.D.; Seidel, G.E. 1978. Superovulation in cows with follicle stimulating hormone and pregnant mares serum gonadotropin. *Theriongenology* 9:17.

Evans, A.C.O., G.P. Adams y N.C. Rawlings. 1994. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil.* 100: 187-194.

Ferguson, J. D.; Galligan, D. T.; Thomsen, N. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 77:2695-2703.

Fernández, T. 2003. Dinámica Follicular: Funcionamiento Y Regulación (En Línea) Departamento de Reproducción Animal, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Consultado 14 Jul. 2008. Disponible en

Fricke, P.M.; Kirsch, J.D.; Reynolds, L.P.; Redmer, D.A. 1994. Studies of FSH induced follicular growth in cows. *Theriongenology*, 42: 43-53.

Galina, C. S.; Arthur, G. H. 1990. Review on cattle reproduction in the tropics. Part 4. Oestrus cycles. *Anim. Breed. Abstr.* 58: 697-707.

Geary, T.W., E.R. Downing, J.C. Bruemmer y J.C. Whittier. 2000. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the Select Synch estrous synchronization protocol. *Anim. Sci.* 16: 1-5.

Gether, U; Kobilka, B K (1998) "G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation" *J. Biol. Chem.* 273:17979-17982

Gigli, I.; Russo, A.; Agüero, A. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equinos, bovino y camélidos sudamericanos (en línea). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires, Argentina. Consultado 14 julio 2008. Disponible en: www.fvet.uba.ar/invet/foliculogenesis1.pdf.

Ginther, O.J.; Kastelic, J.P.; Knopf, L. 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, 20: 187-200.

Gloobe, H. 1989. Anatomía aplicada al bovino. Primera edición. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. San José, Costa Rica. 226p.

Gong JG, Bramley T, Webb R. 1991. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod* 1991; 45:941-949.

Gong JG, Bramley T, Webb R. 1993. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J Reprod Fertil* 1993; 97:247-254.

González M, R.A. y De León G, R.H. 2008. Producción de embriones a través de protocolos de Superovulación Proyecto de Mejoramiento Genético y Biotecnología. Panamá, PA, IDIAP.

González, Y. 1998. Perspectiva de la superovulación, el trasplante de embriones. Seminario de Zootecnia.

Goulding, D.; Willians, D.H.; Duffy, O.; Boland, M.P.; Roche, J.F.. 1990. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology*, 34: 767-778.

Grasso, F.; Guilbault, L.A.; Roy, G.L.; Lussier, J.G. 1989. Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology*, v.31, p.1209-20.

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

Guilbault, L.A.; Grasso, F.; Lussier, J.G.; Matton, P.; Rouillier, P. 1991. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in presence of a dominant follicle. *Journal of Reproduction Science*, v.91, pp.81-9.

Guzmán M. 2002. Factores que afectan la superovulación en vacas. 2002. Monografía como trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia; 2002.

Hafez, E.S.E, Hafez B; 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. Ed. Mc Graw Hill.

Hafez, E.S.E. 1989. Reproducción e inseminación artificial en animales. Interamericana Mc Graw-Hill, 5ta edición. 539 p.

Hafez, E.S.E; Sugie, T.; Gordon, I. 1963. Superovulation and related phenomena in the beef cows. I. Superovulatory response following PMSG y HCG. Injection. J. Reprod. Fertil. 5:381.

Hafez, ESE 1987. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5^o Edición. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill.

Hanlon, D.W., Williamson, N. B.; Wichtel, J. J.; Steffert, I. J.; Craigie, A. L.; Pfeiffer, D. V. 1996. The effect of estradiol benzoate administration on estrous response and synchronized pregnancy rate in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone. Theriogenology 45: 775-785.

Hasler JF, McCauley AD , Schermerhorn EC, Foote RH. 1983. Superovulatory responses of holstein cows. Theriogenology 1983; 19: 83.

Henao, D.; Castillo, L; Olivera, M. 2003. Comportamiento durante el calor y la dinámica folicular interestral en vacas BOM (en línea). Universidad Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Medellín Colombia. Consultado 29 Octubre 2009. Disponible en: <http://www.kogi-udea.edu.co/revista/17/17-1-5.pdf>.

Holy, L. 1987. Biología de la reproducción bovina. Ed. Científico- técnica. La Habana. 344 p.

http://produccionbovina.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/23-ondas_foliculares.htm.

<http://www.agritacna.gob.pe/PUBLICACIONES2007/Sincronizacion-TE.pdf>

http://www.produccionbovina.com/informaciontecnica/transplante_embriones/01-control.htm

Huhtinen, M.; Raino, V.; Aalto, J.; Bredbacka, P. 1992. Increased ovarian responses in the absence of the dominant follicle in superovulated cows. Theriogenology, v.37, pp.457-63,

Hunter, R.H.F. 1982. Reproduction of farm animals. New York, Longman.

Kanagawa, H. 1995. Manual of Bovine Embryo Transfer. Japan Livestock Technology Association. pp 432.

King, M.E., Kiracofe, G. H.; Stevenson, J. S.; Schalles, R. R. 1982. Effect of stage of the estrous cycle on interval to estrus after PGF2 α in beef cattle. Theriogenology 18: 191-200.

Krinninger III CE, Block J, Al-Katanani YM, Rivera RM, Chase CC, Hansen PJ. 2003. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. *Anim Reprod Sci* 2003; 78 (1-2): 13-24.

Langer, F. 1960. Hormonas sexuales inespecíficas y sus probabilidades en el tratamiento de la esterilidad. *Separata veterinar Medizinische. Naohrichten.* 3.

Lerner, S.P., Thayne, W.V.; Baker, R.D.; Henschen, T.; Meredith, S.; Inskeep, E.K.; Dailey, R.A.; Lewis, P.E.; Butcher, R.L. 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.*, 63: 176-183

Leroy JL, Opsomer G, Vlieghe S de, Vanholder T, Goossens L, Geldhof A, Bols PE, Kruif A, Van Soom A. 2005 Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology* 2005; 64: 2022-36.

Lindsell, C.S.; Murphy, B.D.; Mapletoff, R.J. 1986. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-p at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 1986; 26: 209-219.

Macmillan, K.L.; Peterson, A.J. 1993. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrus synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrous. *Anim. Reprod. Sci.* 33: 1-25.

Macmillan, K.L.; Taufa, V.K.; Day, A.M.; Macdougall, S. 1995. Some effects of using progesterone and oestradiol benzoate to stimulate oestrus & ovulation in dairy cows with anovulatory anestrus. *Proc. NZ. Soc. Anim. Prod.* 55:239-241.

Manrique, J. 1990. Fisiología de la reproducción del ganado lechero (en línea). FONAIAP- estación experimental Táchira. Consultado 15 Noviembre 2009. Disponible en: [http:// www.Ceniap.gob.ve/ publica/ divulga/ fd33/ texto/ fisiología.htm](http://www.Ceniap.gob.ve/publica/divulga/fd33/texto/fisiología.htm).

McDonald, L.E. 1981. Reproducción y Endocrinología Veterinaria. Nueva Editorial Interamericana, segunda edición, Mexico, D.F 1981; PP 281-282.

Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW. 2002. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 2002; 57 (4): 1371-87.

Narumiya, S; Sugimoto, Y and Ushikubi, F. 1999 Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* Vol 79 N°4 pp 1193-1226-

Niswender, G D & Nett, T M 1988. Corpus luteum and its control En: Knobl,E & NEIL,J. *The physiology of Reproduction* EdNew york Raven Press pp 489-525.

Oguri, N.; Tsutsumi, Y. 1974. Non- surgical egg transfer in mares. *J. Reprod. Fertil.* 42,313.

Peter, J; Mika, J; Filek, F. 1990. The effect of PMSG priming on subsequent superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology* 1990; 33: 1151-1155.

Peters, A.R. 1986. Hormonal control of the bovine oestrus cycle. II Pharmacological principles. *Br. Vet. J.* 142: 20-29.

Poretsky I, Kalin M. 1987. The gonadotropic function of insulin. *Endocr Rev* 1987;8:134-141

Rieger D, Waltson JS, Goodwin ML, Johnson WH. 1991. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotropin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 1991; 35:863-868.

Rowson, L.E.A.; Moor, R.M.; Lawson, R.A.S. 1969. Fertility following egg transfer in the cow: Effect of method, medium and synchronization of oestrus. *J. Reprod. Fert.* 18: 517-523.

Rowson, L.E.A; Lawson, R.A.S; Moor, R.M; Baker, A.A. 1972. Egg transfer in the cow: Synchronization requirements. *J. Reprod. Fert.* 28: 427-431.

Savio, J.D.; Bongers, H.; Drust, M.; Lucy, M.C.; Theacher, W.W. 1988. Follicular dynamics and superovulation response in cows treated with FSHp in different endocrine states. *Theriogenology* 1988; 35: 915-919

Schaltz, F. 1965. Kritik der therapie mit oestrogenem und gonadotropinem in der. Tierarztlichen praxis. *Schweiz. Arch. Tierhk.* 97:521-534.

Servicios Veterinarios Integrales México. 2007. Transferencia de Embriones en ganado Bovino (en línea). Consultado 2 sept. 2008. Disponible en www.svimexico.com.mx/transferencia_de_embriones_en_ganado_bovino.html

Sharif,N A; Xu,S X; Williams,G W; Crider,J Y, Griffin,B W; Davis,T L (1998) "Pharmacology of 3H prostaglandin E1 / 3H prostaglandin E2 and 3H prostaglandin F2 α binding to EP3 and FP prostaglandin receptor binding sites in bovine corpus luteum: characterization and correlation with functional data" *J. Pharmacol & Exp. Therap.* Vol 286 N°2 pp 1094-1102.

Shea, B.F.; Hines, D.J.; Lighfoot, D.E.; Ollis, G.W.; Olson, S.M. 1976. The transfer of bovine embryos. In Egg Transfer in Cattle. L.E.A. Rowson (ed.). Comission of the European Communities. EUR 5491, Luxembourg, pp. 145-152.

Sorensen, A. 1982. Reproducción animal y principios y prácticas. Trad. R.E. Mata.Ed. Mc Graw-Hill. 539 p.

Sreenan, J. M.; Beehan, D.; Mulvehill, P. 1975. J. Reprod. Fert.

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

Steel R, Hasler JF. 2004. Pregnancy rates resulting from transfer of fresh and frozen Holstein and Jersey embryos. Reprod Fertil Develop 2004; 16: 182-183 (abst).

Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 2nd Edition. McGraw-Hill Publishing Co., New York. USA.

Sumano Ocampo. Farmacología Veterinaria. fisiología y farmacología de la reproducción Segunda edición.

Tervit, H.R. 1976. Techniques and hazards of embryo manipulation and induction of parturition. New Zealand Vet. J. 24: 74-79.

Tervit, H.R.; Smith, J.F. 1975. Egg transfer in cattle: Effect of hormonal treatment on synchronization of oestrus and ovarian response. Proc. New Zealand soc. anim. Prod. 35: 78-82.

Urroz, C. 2000. Anatomía y fisiología animal. Ed. Universidad estatal a distancia. San José, Costa Rica. pp 200-205.

Vane,J R & Botting,R M. 1994. Biological properties of cyclooxygenase products En: The handbook of immunopharmacology. Lipid mediators. Chap 3 pp 61-97 Ed. CUNNINGHAM,F M Academic Press. Hartcourt Brace & Company, Publishers.

Willet, E.L.; Shawnc, W.H.; Meyer, R.K. 1952. Relation of stage of cycle and source of luteinizing hormone to superovulation dairy cattle. Proc. Soc. Exptl. Boil. Med. 79:396.

Willis, A L & Smith, D L. 1994. Metabolism of Arachidonic Acid: an overview. En: The handbook of immunopharmacology. Lipid mediators. Chap 1 pp 1-32 Ed.

Wright, M.J. 1998. Efficiency of the Bo Vet Creations Embryo Freezer. Genetics Managements Service. Castroville, Texas. Disponible en: www.snitt.org.mx/pdfs/tecnologias/BovinosC/ARCHIVO30.pdf