



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y SERVICIO EN ZOOTECNIA
POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

POBLACIÓN FOLICULAR Y ÉPOCA EN LA EFICIENCIA DE UN PROGRAMA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES DIVIDIDOS EN VAQUILLAS HOLSTEIN

TESIS

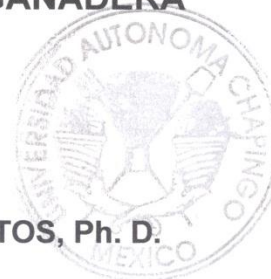
**Que como requisito parcial
para obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

PEDRO MEDA ALDUCIN

Bajo la supervisión de: RAYMUNDO RANGEL SANTOS, Ph. D.



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Julio 2012

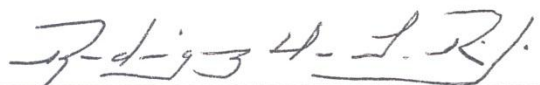
Chapingo, Estado de México

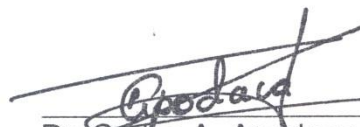
**POBLACIÓN FOLICULAR Y ÉPOCA EN LA EFICIENCIA DE UN
PROGRAMA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES DIVIDIDOS EN
VAQUILLAS HOLSTEIN**

Tesis realizada por Pedro Meda Alducin bajo la supervisión del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener
el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA


DIRECTOR: Ph. D. Raymundo Rangel Santos


ASESOR: Ph.D. Raymundo Rodríguez de Lara


ASESOR: Dr. Carlos A. Apodaca Sarabia

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
AGRADECIMIENTOS.....	8
DEDICATORIAS	9
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	10
2. REVISIÓN DE LITERATURA	12
2.1 Programas de transferencia de embriones (TE)	12
2.2 Clasificación de embriones	13
2.3 Vaquillas en la producción de embriones.....	15
2.4 Semen sexado	17
2.5 Ultrasonografía.....	18
2.6 División de embriones.....	19
2.7 Estrés calórico.....	22
2.8 Desarrollo folicular en vaquillas.....	23
2.8.1 Factores reguladores del crecimiento, desarrollo y diferenciación folicular.	23
2.8.2 Desarrollo de ondas foliculares	24
2.9 Poblaciones Foliculares	25
2.9.1 Población folicular y producción de embriones y ovocitos	26
2.9.2 Población folicular y balance hormonal	27

2.9.3	Población folicular en receptoras de embriones.....	28
2.10	Literatura citada	29
3.	Población folicular y época en la eficiencia de un programa de producción de embriones divididos en vaquillas Holstein	34
3.1	Resumen.....	34
	Follicular population and Season in the efficiency of a split embryo transfer program in Holstein heifers	35
	Abstract.....	35
3.2	INTRODUCCIÓN	36
3.3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
3.3.1	Área de estudio	38
3.3.2	Animales y ultrasonografía.....	38
3.3.3	Diseño experimental.....	39
3.3.4	Programa de transferencia de embriones	39
	Sincronización del estro y superovulación	39
	Recolección y división de embriones	40
	Sincronización de estro en vaquillas receptoras y transferencia de embriones	41
	Alimentación de las vaquillas	41
	Variables evaluadas.....	41
3.3.5	Análisis Estadístico	42
3.4	Resultados y discusión.....	43

3.4.1	Población folicular	43
3.4.2	Respuesta en donadoras	45
	Respuesta en receptoras.....	48
3.5	Conclusiones.....	51
3.6	LITERATURA CITADA:.....	52

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de las vaquillas en el estudio por población folicular y época del año.	39
Cuadro 2. Estructuras colectadas de vaquillas donadoras con alta (APF) o baja (BPF) población folicular durante épocas cálida (EC) y fría (EF) y su interacción.	46
Cuadro 3. Características del estro y porcentaje de gestación (Gest) de vaquillas sincronizadas con alta (APF) o baja (BPF) población folicular durante épocas cálida (EC) y fría (EF) y su interacción.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reducción del intervalo generacional en programas de transferencia de embriones.	16
Figura 2. Actividades en el protocolo de transferencia de embriones.	40
Figura 3. Distribución del promedio de folículos ováricos ≥ 3 mm de vaquillas Holstein vírgenes escaneadas mediante ultrasonografía cuatro veces a intervalos de 10 días.	44

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

Al Ph.D. Raymundo Rangel Santos por sus valiosas enseñanzas en la dirección de este proyecto, por su amistad, tiempo, confianza, y dedicación en mi formación.

A los profesores Raymundo Rodríguez y Carlos A. Apodaca por sus valiosos consejos y contribuciones en la presente investigación.

Al Posgrado en Producción Animal por darme la oportunidad de dar un paso más en mi carrera profesional, en especial a los profesores Rafael Núñez, Maximino Huerta y Rodolfo Ramírez por su amistad y consejos.

A los Ingenieros José Jaimes Jaimes, Ángel Hernández Cruz y Juan Carlos García, por su amistad, confianza y gran apoyo en mi formación profesional.

A mis amigos y compañeros de generación y de otras generaciones de este posgrado: Ernesto, Luis Antonio, Gilberto, Carlos Delfino, Renato, Leodan, Oscar, Saul, José Luis, Juan, María Elena, Trinidad, y demás compañeros que hicieron mi estancia en Chapingo una enriquecedora experiencia.

A mis grandes hermanos de la vida Pablo, Jorge, Víctor Hugo y Marcelino.

A Silvia Larios C. por tu, cariño, comprensión, confianza.

DEDICATORIAS

A mi Familia, por ser mi más grande pilar en la vida.

A mis padres Francisco Meda Ortiz y Marta Guadalupe Alducin Romero quienes a demás de darme la vida son mi ejemplo de trabajo, disciplina, respeto, honestidad, amor y humildad.

A mis hermanos Fernando y Leonardo Meda Alducin, por la paciencia, apoyo, cariño, comprensión y amistad en todo momento.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los programas de transferencia de embriones (TE), son utilizados como una herramienta para acelerar el mejoramiento genético. Sin embargo, las respuestas en la obtención de embriones en donadoras, así como la tasa de gestación en receptoras son variables. Algunas alternativas para tratar de reducir la variabilidad en la respuesta de los programas de TE tanto en la obtención de embriones como en el incremento de los porcentajes de preñez son el uso de vaquillas, semen sexado, la división de embriones y la ultrasonografía.

El ciclo estral del ganado ha sido frecuentemente modificado mediante tratamientos hormonales para tratar de inducir la sincronía del celo en grupos de animales durante un período determinado. La sincronización de estros ayuda a mejorar la eficiencia reproductiva al implementar adecuadamente técnicas como la inseminación artificial (IA) o TE. La falta de detección de celos, fallas en ovulación, presencia de folículos chicos, asincronía en el estro y presencia de cuerpo lúteo, son algunos de los factores que pueden influir en la exclusión de vacas de programas reproductivos.

El efecto detrimental del estrés calórico sobre la reproducción de ganado lechero es ampliamente reconocido y una de las estrategias más efectivas para mejorar la fertilidad de vacas lactantes expuestas a estrés calórico es la transferencia de embriones.

En vacas superovuladas, la selección de donadoras en base a su número de folículos ováricos >3 mm puede influir en la producción de embriones transferibles y el total de estructuras colectadas (Ireland *et al.*, 2007).

Sin embargo, el efecto de las poblaciones foliculares (PF) en la fertilidad de vacas y vaquillas aún no es claro (Starbuck-Clemer *et al.*, 2007; Mossa *et al.*, 2012).

La presente investigación pretende probar si la evaluación de poblaciones foliculares y la época del año mejoran la respuesta e incrementan el número de embriones transferibles, además de probar si afecta el porcentaje de gestación en receptoras en un programa de transferencia de embriones divididos en vaquillas Holstein.

En el Capítulo 2 se hace una revisión de literatura que aborda temas relacionados con la transferencia y división de embriones, sus implicaciones, y sus aplicaciones en ganado bovino, también se presenta una breve descripción de estrategias para incrementar la producción de embriones y el número de remplazos, y finalmente los factores relacionados al desarrollo folicular con hincapié en el efecto de las poblaciones de folículos ováricos en el balance hormonal, producción de embriones y fertilidad en ganado bovino.

En el Capítulo 3 se presentan los resultados generados de un estudio realizado en vaquillas Holstein cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la población de folículos ováricos ≥ 3 mm en la producción de embriones en donadoras y características del celo y supervivencia embrionaria en receptoras en épocas cálida y fría.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Programas de transferencia de embriones (TE)

La inseminación artificial, permitió aumentar la tasa anual de cambio genético, lo que se debe a: i) aumento en el número de crías por semental por año, incluyendo el que su prole se distribuya en un gran número de explotaciones, ii) aumento en la intensidad de selección, y iii) aumento en la exactitud con que los machos son seleccionados. De esta forma, por las diferencias en intensidad de selección y exactitud entre machos y hembras, los machos aportan el 70% del cambio genético esperado (Van Vleck *et al.* 1987). La TE, puede aumentar el número de progenies producidas por unidad de tiempo en las hembras. Y aún cuando nunca será igual al número de crías producida por los machos, potencialmente se puede obtener aumento en la presión de selección y la exactitud por el lado de las hembras. Esperando aumento adicional en la tasa de cambio genético. Sin embargo, la variabilidad obtenida en la respuesta ovulatoria hace necesario investigar para mejorar sus parámetros.

Los programas de TE en bovinos comienzan por seleccionar vacas o vaquillas de alto mérito genético como donadoras, a la par de seleccionar hembras receptoras de la calidad genética disponible. La donadora es sincronizada con prostaglandinas y progestágenos, posteriormente es superovulada con inyecciones diarias de hormona folículo estimulante, e inseminada a partir de las 12 horas posteriores al inicio del estro. El ciclo estral de las receptoras debe sincronizarse con el de las donadoras tomando en cuenta que tienden a presentar el estro previo a las receptoras. Los embriones se recuperan generalmente siete días después de la inseminación (Curtis, 1991).

Una vez colectados e identificados, los embriones pueden ser transferidos de inmediato como embriones frescos o congelarse para su posterior utilización, sin embargo, los embriones frescos generan mayores tasas de gestación que los criopreservados (Farin y Farin, 1995).

La gran variabilidad en respuesta a la superovulación y producción de embriones, es uno de los mayores problemas en los programas de TE. En su revisión Mapletoft (2006) menciona que en 1986, en un estudio que evaluó 2048 colectas de embriones en ganado bovino productor de carne, se obtuvo un promedio de 11.5 embriones totales, de los que en promedio 6.2 embriones fueron transferibles, el 24% de las recolecciones no produjeron embriones viables, un 64% de las donadoras generaron menos del promedio de embriones transferibles y el 30% de las donadoras produjo el 70% de los embriones totales recolectados. Resultados que muestran la dificultad de predecir la respuesta ovulatoria ocasiona problemas que afectan la eficiencia y rentabilidad de los programas de TE. No obstante, Sartori *et al.* (2002) consideran que la transferencia de un embrión puede reducir problemas de infertilidad como fallas en la fertilización y pérdidas embrionarias tempranas, particularmente durante el estrés calórico.

Diversas técnicas y tecnologías se han evaluado para reducir la variabilidad en la respuesta de los programas de TE tanto en la obtención de embriones como en el incremento de los porcentajes de preñez, entre ellos el uso de vaquillas, semen sexado, la división de embriones y la ultrasonografía tienen un gran potencial.

2.2 Clasificación de embriones

Las etapas de desarrollo embrionario han sido definidas retrospectivamente mediante la observación morfológica basada en el número de días después de la ovulación. FAO (1991) y Palma (2001) describen el desarrollo de los embriones de la siguiente manera:

Mórula (día 4-6) es una “bola” solida de blastómeros con una zona pelúcida, típicamente contiene de 16 a 32 blastómeros o de 32 a 64 cuando se considera mórula compacta (cuatro a seis divisiones celulares).

Blastocito temprano (día 6.5-7): Se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas y por la formación de una cavidad (blastocelo) en el interior del embrión. Ocupa del 70-80% del espacio perivitelino. Es posible diferenciar el trofoblasto de la masa celular interna.

Blastocito (día 7-8): La masa celular interna es más compacta y oscura (100-200 células), las células del trofoblasto están más separadas, el blastocelo es evidente ocupando gran parte del espacio perivitelino.

Blastocito expandido: En este caso el blastocelo se distingue perfectamente ocupando la mayor parte del espacio perivitelino y en ocasiones la totalidad de este. El embrión ha crecido de 1.2 a 1.5 veces su tamaño normal y el grosor de la zona pelúcida se ha reducido en una tercera parte

Blastocito eclosionado: Cuando el blastocelo se expande totalmente, las células embrionarias rompen la zona pelúcida y salen al exterior. El embrión eclosionado es redondeado hasta el día 12, tomando después una forma oval que crece con rapidez.

Diversos autores clasifican a los embriones por calidad basados en sus características morfológicas de excelente a mala calidad (grados 1 a 4). Palma (2001) describe las características de los embriones clasificados por su calidad de la siguiente manera:

Excelente: Embrión con desarrollo perfecto. Los blastómeros son claramente visibles, de color y estructura uniformes, con forma simétrica.

Buena: Embriones que presentan pequeñas imperfecciones como zona pelúcida ovalada, muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de detritus celulares.

Regular: Anormalidades definidas pero no severas como un moderado número de células excluidas, tamaño pequeño, pequeña cantidad de degeneración, o retraso en su desarrollo no mayor a un día.

Mala: Degeneraciones considerables, células vesiculadas, gran variación de tamaño celular, falla en la compactación, pobre o retardado desarrollo celular mayor a dos días.

Estudios han reportado que la calidad de los embriones afecta ($p<0.05$) la supervivencia de embriones producidos *in vivo* o *in vitro* (Farin y Farin, 1995), así como el desarrollo y supervivencia de hemiembriones (McEvoy y Sreenan, 1990).

2.3 Vaquillas en la producción de embriones

Es generalmente aceptado que las vaquillas, en comparación a vacas de primer parto o multíparas, presentan un mejor alternativa para trabajos reproductivos debido a su baja tasa de problemas reproductivos y mayor fertilidad (Haugan *et al.*, 2005).

El uso sistemático de vaquillas para la obtención de embriones presenta algunas ventajas en comparación a las vacas lactantes. Sales y Sauza (2005) reportaron un mayor número promedio de embriones recuperados de vaquillas (10.21) en comparación a vacas (6.31) inseminadas 12 y 24 h posteriores a la aparición del celo. En otro estudio en vacas y vaquillas Holstein durante el verano (Sartori *et al.*, 2002), reportaron que calidad de los embriones recuperados y la tasa de fertilización (2.2 y 100%) fue mejor ($p<0.05$) en vaquillas en comparación a vacas lactantes (3.8 y 55.5%), de igual forma, en

vaquillas, el porcentaje de recuperación de embriones fue 39, mientras en vacas se estimó en 30%.

Una ventaja adicional del uso de vaquillas como donadoras en programas de TE es que presenta una oportunidad significativa para acelerar la ganancia genética del hato y reducir el intervalo generacional, teniendo la ventaja de no estar sometidas al estrés de la producción de leche.

Un estudio en vaquillas Holstein púberes y pre-púberes (Ax *et al.*, 2005), reportaron un promedio de 4.8 embriones transferibles colectados por vaquilla en animales de 10 meses de edad en adelante, mayor ($p<0.05$) que los obtenidos de vaquillas con 7.8 a 9.9 meses de edad (2.8), la recuperación de embriones se incrementó conforme incrementó la edad del animal.

La implementación de un programa de TE considerando un esquema adecuado de selección de vaquillas de alto mérito genético puede ser una alternativa para reducir el intervalo generacional de una manera rápida. Esto cuando las donadoras comienzan su primer lactancia y generan registros de lactación que pueden coincidir con las de sus crías provenientes de TE, permitiendo observar el comportamiento productivo de las hijas para implementar un nuevo programa de TE (

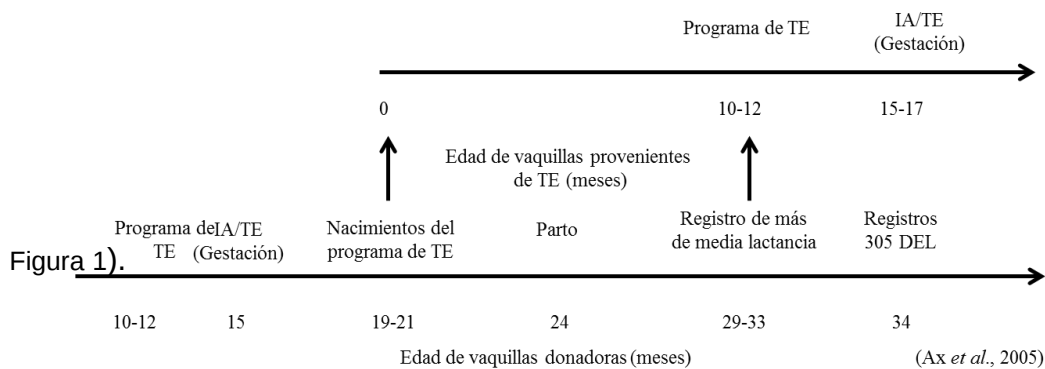


Figura 1. Reducción del intervalo generacional en programas de transferencia de embriones.

2.4 Semen sexado

Entre las compañías distribuidoras de semen para la inseminación artificial, se ofertan dosis de semen sexado, con hasta un 90% de crías producidas con un sexo determinado, significando una opción interesante para los productores (Hayakawa *et al.*, 2009; Peippo *et al.*, 2009). Así, en hatos lecheros se puede incrementar el número de remplazos, o incrementar el número de machos generalmente requerido en granjas productoras de pie de cría con alto valor genético.

En ganado bovino los espermatozoides “X” contienen aproximadamente un 4 % más ADN que el espermatozoide “Y”. Aunque esta diferencia es pequeña, es posible medir el contenido de ADN de los espermatozoides individualmente con una precisión suficiente para distinguir entre los X e Y con una precisión del 90% aproximadamente para el 50% de los espermatozoides. Por lo tanto, cerca de la mitad de los espermatozoides se descartan como no aptos para sexado existiendo una tasa de error del 10% para aquellos sexados con este procedimiento. El método funciona mediante la tinción de los espermatozoides con un colorante fluorescente de unión a ADN con el que el esperma masculino y femenino puede ser cargado eléctricamente de forma diferente. Esto permite su separación por un clasificador de células activadas por fluorescencia (Seidel, 2007).

El semen sexado contendrá una concentración de espermatozoides por pajilla de aproximadamente 2 millones, la cual es menor a la concentración del semen convencional (aproximadamente 20 millones) posiblemente debido a que el

proceso de clasificación es relativamente lento y la cantidad de semen descartado es alta.

Debido a dosis con concentraciones más bajas de espermatozoides por pajilla, y posiblemente un efecto negativo del proceso de selección, la fertilidad del semen sexado es típicamente más baja en comparación con el semen convencional (Hayakawa *et al.*, 2009; Peippo *et al.*, 2009) por lo que se recomienda su uso los primeros servicios de vaquillas, de tal manera, en hatos lecheros se puede incrementar el número de reemplazos, o incrementar el número de machos generalmente requerido en granjas productoras de pie de cría con alto valor genético.

La efectividad de la técnica de sexado del semen es posible determinarla al nacimiento de la cría, mediante ultrasonografía del feto, o bien mediante el sexado del embrión. El diagnóstico del sexo en el embrión se realiza a través de una intervención microquirúrgica para extraer una pequeña porción de material celular, el cual es analizado por técnicas de PCR. Los blastómeros que se pierden en la división microquirúrgica pueden ser empleados para el diagnóstico del sexo, y la disminución de la preñez ocasionada por la biopsia puede ser compensada a través de la transferencia de las mitades resultantes (Lopatarova *et al.*, 2008).

La alteración de la proporción de sexos también podría aumentar la eficacia de los programas de IA, así como la eficiencia en programas de producción transferencia de embriones *in vivo* e *in vitro*.

2.5 Ultrasonografía

El principio del funcionamiento de la ultrasonografía se basa en la emisión de ondas sonoras de alta frecuencia para producir imágenes de tejidos blandos y órganos internos. Al ser una técnica no invasiva, es ideal para el examen del aparato reproductor femenino y masculino de bovinos. Un transductor de 5.0 a

7.5 MHz es adecuado para obtener imágenes de buena calidad de los diferentes tejidos y órganos reproductivos.

Existen múltiples aplicaciones de la ultrasonografía en la reproducción y manejo de ganado lechero, por ejemplo: evaluación de crecimiento folicular, atresia, medición de la tasa de ovulación, poblaciones foliculares, formación de cuerpo lúteo, anormalidades ováricas, quistes y detección de infecciones uterinas, sin embargo, el diagnóstico temprano de gestación es la aplicación más común de esta tecnología.

El uso de la ultrasonografía ha permitido realizar estudios sobre la morfología ovárica, del cuerpo lúteo y sobre la ovulación (Pierson y Ginther, 1986; Lucy *et al.*, 1992), así como la dinámica y morfología del útero y se han logrado exámenes ultrasónicos del feto, incluyendo la identificación del sexo (Brad y Stroud, 2005).

En el ganado lechero el ciclo estral dura entre 18 y 24 días, lo cual permite que se desarrollen dos, tres o incluso cuatro ondas foliculares, al final de ellas sólo un folículo, el dominante de 12 a 15 mm de diámetro ovula (Lucy *et al.*, 1992).

La mayor ventaja de la ultrasonografía es la posibilidad de realizar el seguimiento dinámico y periódico del mismo animal. Ello ha permitido descubrimientos de gran importancia para la reproducción animal y a mejorar la comprensión de los eventos que ocurren durante el ciclo estral.

Starbuck-Clemer *et al.* (2007) reportaron que el simple uso cotidiano de la ultrasonografía incrementó las tasas de concepción en ganado productor de carne, posiblemente debido a una mayor exactitud en la determinación del tiempo de la ovulación, de igual forma el seguimiento constante de la actividad ovárica puede ayudar a predecir la respuesta a tratamientos gonadotrópicos al seleccionar las vaquillas con mayor número de folículos antrales. Dicha estrategia de manejo puede llevar a un importante mejoramiento en la

respuesta a tratamientos de superovulación en programas de TE (Singh *et al.*, 2004; Ireland *et al.*, 2007).

2.6 División de embriones

En la década de 1970 se inició, en Cambridge, la incursión en trabajos enfocados a la microcirugía de embriones y la producción de mellizos idénticos. Producción basada en la división de embriones mediante su micromanipulación en estadio de mórula o blastocito, en dos o más hemiembriones, sin embargo, estudios indican que existe una relación inversa entre el número de secciones en que se divide el embrión y su capacidad de supervivencia.

La división de embriones se justifica por dos razones principales, la primera es la obtención de gemelos idénticos, que son útiles para la investigación, y el segundo es aumentar la productividad de los programas de TE. Bajo condiciones comerciales se puede producir tasas de gestación mayores al 100% (Kippax *et al.*, 1991) en relación a los embriones obtenidos, al transferir hemiembriones en comparación a las obtenidas al transferir un embrión completo. Los embriones generados a partir de embriones divididos pueden ser llamados embriones clonados, sin embargo, este procedimiento produce sólo un número limitado de clones, principalmente gemelos (Seike *et al.*, 1989).

El procedimiento estándar para realizar la división de embriones inicia con la fijación del embrión. Fijación que se puede realizar haciendo una depresión en la caja de petri, adhiriéndolo a la superficie usando un medio de cultivo libre de proteínas, o con la ayuda de un manipulador y una micropipeta de vidrio, fijando al embrión por aspiración de la zona pelúcida. Un micromanipulador (del lado opuesto al de fijación si es el caso) debe estar provisto de un instrumento cortante que puede ser una micropipeta de vidrio, un trozo de hoja de afeitar o una micronavaja para cirugía. Los manipuladores suplementarios pueden estar equipados con microinstrumentos adicionales que permiten diferentes manipulaciones del embrión y las mitades producidas, así como su

desplazamiento en la placa. Una microaguja permite seccionar o separar aquellas mitades que no fueron divididas en su totalidad. Un brazo de mortero permite desplazar los embriones divididos sin provocar traumatismos. Una micropipeta en forma de gancho puede abrir la zona pelúcida para extraer el embrión de su interior. Los instrumentos con excepción del microescalpelo, deben ser confeccionados a partir de finos tubos de vidrio con ayuda de un estirador de pipetas y una microfragua (Palma, 2001)

La división de los embriones provoca una pérdida celular de aproximadamente 10% (McEvoy y Sreenen, 1990), lo cual puede comprometer la supervivencia de los embriones de calidad inferior, por lo que se sugiere dividir sólo embriones de excelente y buena calidad.

Las mórulas compactas y los blastocitos divididos no necesariamente deben ser introducidos a zonas pelúcidas vacías, su ausencia no afecta su capacidad de supervivencia al ser transferidas en hembras receptoras (Warfield *et al.*, 1987). Después de la micromanipulación cada hemiembrión puede ser transferido a una receptora, o brevemente incubado ya sea *in vitro* o en oviductos ligados de coneja u oveja (Gordon, 2004).

El éxito de la división de embriones ha sido demostrado por la generación de gemelos idénticos en ganado ovino (Shelton y Szell, 1988), caprino (Nowshari y Holtz, 1993), porcino (Reichelt y Niemann, 1994) y bovino (Lopatarova *et al.*, 2008)

Diversos factores pueden afectar la viabilidad y de los embriones micromanipulados. Dependiendo de la calidad de los hemiembiones los resultados pueden variar para mitades de calidad buena, y para aquellas de calidad baja. Otros factores que pueden afectar la viabilidad del embrión dividido incluyen la cantidad de divisiones del embrión (FAO, 1991), el sistema

de cultivo (King *et al.*, 1992), la criopreservación (Nowshari y Holtz, 1993) y el tipo de transferencia (Warfiel *et al.*, 1987).

El uso de semen sexado en combinación con la división de embriones puede incrementar al doble la eficacia económica de los programas de TE, considerando que se podría producir un 90% de crías ya sea para reemplazos o venta de sementales.

2.7 Estrés calórico

El estrés calórico es la combinación de elevada temperatura del aire, radiación solar, y humedad, juntos reducen la pérdida de calor por convección del animal aumentando la temperatura corporal. Tales condiciones se complican en vacas lactantes, mismas que producen más calor que vacas en otro estado fisiológico. Reproductivamente, el estrés calórico reduce la fertilidad explicándose por: disminución en la calidad de los ovocitos, tasa de fertilización reducida, y elevada mortalidad embrionaria (Hansen, 2007).

Hansen y Fuquay (2011) mencionan tres períodos en el ciclo reproductivo de las hembras en los que el estrés calórico ocasiona reducción en el porcentaje de preñez. El primero cuando el estrés calórico se presenta entre 90 y 110 día antes de la ovulación, fase de crecimiento del ovocito lo cual puede reducir su competencia y desarrollo. El segundo es el período periovulatorio, en el que en condiciones experimentales, el estrés calórico no disminuyó la tasa de fertilización, pero si la capacidad de los embriones para desarrollarse normalmente. El tercer período corresponde al desarrollo embrionario temprano, en el cual se puede ver comprometido el reconocimiento materno.

En vacas gestantes, se ha reportado en que la exposición crónica a altas temperaturas ambientales resulta en bajos pesos fetales, lo que puede estar relacionado a un bajo flujo sanguíneo a través de la placenta impidiendo un adecuado desarrollo fetal (Reynolds *et al.*, 1985).

Sartori *et al.* (2002), reportaron que la calidad de los embriones recuperados y la tasa de fertilización es mejor ($p<0.05$) en vaquillas (2.2 y 100%) en comparación a vacas lactantes (3.8 y 55.5%) en tiempo de estrés calórico, y a la vez observaron una tendencia a incrementar la tasa de recuperación de embriones en vaquillas (39.5%) respecto a vacas (30%). Sin embargo, el número de estructuras totales recuperadas fue similar (38 vs 41) entre vacas lactantes en verano e invierno. Por otro lado, Stewart *et al.* (2011) en un estudio en vacas Holstein en estrés calórico, estimaron un aumento de 24% (42 vs 18%) en la tasa de preñez mediante TE de embriones producidos *in vitro* y semen sexado en comparación con inseminación artificial.

2.8 Desarrollo folicular en vaquillas

Desde el desarrollo fetal las hembras tienen definido el número de ovocitos disponibles para su futura vida reproductiva (14000 a 250000) (Erickson, 1966). Una vez nacida, la vaquilla comienza el desarrollo de su sistema reproductor presentando folículos antrales visibles, a partir de la segunda semana de vida (Desjardins y Hafs, 1969). Dicha cantidad de folículos presenta un pico de crecimiento a los cuatro y ocho meses de edad. El tamaño de la vagina y cérvix se incrementan gradualmente a partir de los cuatro meses de edad, y rápidamente después de la primera ovulación, mientras que el tamaño del útero se incrementa constantemente desde el nacimiento hasta la primera ovulación. Rawlings *et al.* (2003) observaron crecimiento de los ovarios en dos etapas, la primera de las 2 a 14 semanas y la segunda de las 34 a las 60 semanas y el crecimiento del folículo de mayor diámetro se presenta en un patrón similar al crecimiento de los ovarios.

Factores reguladores del crecimiento, desarrollo y diferenciación folicular.

En el ciclo estral del bovino se desarrollan de una a cuatro ondas de crecimiento folicular (Lucy *et al.* 1992), dividiéndose cada una en fase de

reclutamiento, selección, dominancia y atresia, ocurriendo la ovulación en la última onda folicular.

El reclutamiento folicular es la formación de una población de folículos antrales, de donde uno o varios folículos son seleccionados para la ovulación. En dicho proceso un aumento transitorio de FSH precede al reclutamiento de los folículos (Webb *et al.*, 2003). La selección es la fase en la que un folículo estrogénicamente activo promueve su crecimiento e inhibe el desarrollo de los demás folículos mediante la secreción de inhibina y estradiol, al reducir las concentraciones de FSH (Sunderland *et al.*, 1994). La dominancia es el mecanismo mediante el cual un folículo dominante continúa su rápido crecimiento en un medio donde el desarrollo y crecimiento de otros folículos reclutados al mismo tiempo es suprimido (Webb *et al.*, 1999). La atresia es el proceso en el cual los folículos antrales en ausencia de factores requeridos para su maduración y ovulación dejan de crecer y empiezan a degenerarse. La ovulación es un proceso en el cual el folículo preovulatorio se rompe y libera un ovocito maduro con capacidad de ser fecundado (Acosta, 2007).

Desarrollo de ondas foliculares

El ovario bovino contiene un gran conjunto de folículos primordiales desde el nacimiento, sin embargo, menos del 0.1% de los folículos presentes en el ovario ovulan durante la vida reproductiva de la vaca (Erickson, 1966). La mayoría de los folículos que entran al grupo de crecimiento están destinados a sufrir atresia, sin embargo, los tratamientos cortos con gonadotropinas estimulan el crecimiento de los folículos antrales hasta alcanzar un tamaño ovulatorio.

Las vacas Holstein se caracterizan por presentar 2 ondas foliculares, mientras que las vaquillas Holstein al igual que las vacas para producción de carne presentan de dos a tres ondas foliculares iniciando los días 2 y 11 ó 2, 9 y 16, respectivamente (Evans *et al.*, 2003). Al respecto, Townson *et al.* (2002) indicaron que las vacas que presentan dos ondas foliculares por ciclo tienden a

presentar ciclos cortos, y ovulan folículos más grandes y viejos teniendo una menor fertilidad que el ganado con tres ondas por ciclo.

La principal hormona que induce el crecimiento de folículos antrales durante las ondas foliculares es FSH. Los folículos antrales que se desarrollan producen estradiol e inhibina, los cuales actúan en la retroalimentación negativa de FSH. El factor análogo a Insulina 1 (IGF-1) también interactúa con FSH para promover el crecimiento folicular, y simular o incrementar la acción de FSH sobre las células de granulosa en bovinos (Burns *et al.*, 2005). Ireland *et al.* (2007) observaron que las concentraciones séricas de FSH están inversamente relacionadas con la variación del número de folículos en las ondas ovulatorias y no ovulatorias en vaquillas para carne, encontrando que el número de folículos antrales no varía entre ondas foliculares, por lo que la población folicular puede considerarse como una característica morfológica confiable para clasificar hembras.

2.9 Poblaciones Foliculares

Los folículos antrales crecen en un patrón ondulatorio, consistente en el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos precedido por un aumento transitorio de las concentraciones séricas de FSH (Adams *et al.*, 1992).

Está ampliamente documentado que la presencia de folículos dominantes producen factores que inhiben el crecimiento de los folículos subordinados, sin embargo, Cushman *et al.* (2009) no encontraron efecto negativo de la presencia de folículos dominantes sobre su PF.

La variación en el número de folículos que responden a FSH presentes en el ovario al inicio del tratamiento de superovulación, ha sido estimada en un 70%, existiendo una correlación positiva ($p < 0.05$) entre el número de folículos en la superficie del ovario y la respuesta superovulatoria. La cantidad de folículos antrales en la superficie del ovario ha sido correlacionada con su peso al

nacimiento, peso del ovario y número de folículos al nacimiento (Cushman *et al.*, 2009). El número de folículos ≥ 3 mm de diámetro reclutados en cada ciclo se ha determinado en distintos días del ciclo estral en ganado productor de carne, y en vaquillas y vacas Holstein (Singh *et al.*, 2004; Starbuck-Clemer *et al.*, 2007; Ireland *et al.*, 2007). Los resultados mostraron que la población folicular es muy variable entre los animales, pero altamente repetible (0.85 a 0.95) en los individuos (Burns *et al.*, 2005; Jimenez-Krassel *et al.*, 2009; Mossa *et al.*, 2012). Investigaciones previas en bovinos (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007) han reportaron que el número máximo de folículos ≥ 3 mm de diámetro durante diferentes ondas foliculares de bovinos e incluso entre estaciones del año, es constante y altamente repetible, a pesar de las diferentes concentraciones hormonales durante el ciclo estral.

Los resultados de la literatura confirman que tanto vacas como vaquillas pueden ser clasificadas morfológicamente de una manera confiable en base a su población de folículos antrales.

Población folicular y producción de embriones y ovocitos

Estudios en bovinos (Ireland *et al.*, 2007) y ovinos (Mossa *et al.*, 2007) han demostrado que la proporción de embriones transferibles es baja en hembras con poblaciones foliculares altas en comparación con las de baja población folicular, sin embargo, el número total de embriones transferibles es mayor en las primeras.

La capacidad de respuesta a la superovulación y el éxito de la aspiración folicular y la TE han sido negativamente asociados con la edad y la reducción en el número de folículos y ovocitos en los ovarios (Cushman *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2004).

Los animales con una baja PF tienen ovarios más pequeños en comparación con las vacas de la misma edad con una mayor PF (Ireland *et al.*, 2008), lo cual

podría ser un indicador de una baja respuesta a tratamientos con gonadotropinas. Por otra parte, las hembras con una baja PF tienen una respuesta reducida a la superovulación (Singh *et al.*, 2004; Ireland *et al.*, 2007). En general los estudios concuerdan en que vacas con una baja PF tienen una capacidad de respuesta inferior a la superovulación y producen una cantidad significativamente menor de embriones de buena calidad.

Población folicular y balance hormonal

Algunos estudios recientes han demostrado que las concentraciones basales de FSH (Ireland *et al.*, 2008; Mossa *et al.*, 2010) y LH (Jimenez-Krassel *et al.*, 2009) son más bajas en animales con alta PF en comparación a los animales con baja PF.

Mossa *et al.* (2010) evaluaron la respuesta a la aplicación de líquido folicular y GnRH en vacas ovariectomizadas que tenían una alta o baja PF. No se encontraron diferencias entre los dos grupos en la concentración basal de FSH o secreción de LH, deduciendo que las diferencias en la secreción de gonadotropinas entre animales con alta y baja PF es debida a diferencias en la concentración de hormonas esteroidales y no a diferencias en la función de la pituitaria.

Evidencia de que el número total de folículos sanos en los ovarios contribuye al medio ambiente endocrino es proporcionada por la hormona anti-Mülleriana (AMH). La AMH es producida principalmente por las células de la granulosa de folículos en crecimiento (Rico *et al.*, 2009). Recientemente se ha demostrado que las concentraciones de AMH pueden predecir la PF y el número de ovocitos en vacas y vaquillas (Ireland *et al.*, 2008), y que las concentraciones de AMH en suero antes de la superovulación están altamente correlacionadas con el número de ovulaciones después del tratamiento (Rico *et al.*, 2009).

Las concentraciones séricas de estradiol e inhibina-A no son diferentes entre los grupos de animales con alta y baja PF (Ireland *et al.*, 2008), debido a que los folículos de los animales con baja PF tienen concentraciones de estradiol más altas en el líquido folicular en comparación con animales de alta PF, lo cual puede estar asociado a las mayores concentraciones de FSH en las hembras con baja frente a alta PF (Mossa *et al.*, 2010).

Los animales con baja PF tienen concentraciones de progesterona baja durante el ciclo estral comparativamente a animales con alta PF (Jimenez-Krassel *et al.*, 2009). Además las células de la granulosa y células lúteas de los animales con una baja PF tienen menos capacidad para producir progesterona *in vitro* en comparación a los animales con alta PF.

Población folicular en receptoras de embriones

Se ha determinado en investigaciones previas que los bovinos con poblaciones foliculares relativamente altas pueden presentar mejores respuestas tanto en fertilidad, como en el número de estructuras colectadas en vacas y vaquillas donadoras de embriones (Gong *et al.*, 1996; Cushman *et al.*, 1999; Ireland *et al.*, 2007; Cushman *et al.*, 2009), sin embargo, no está claramente dilucidado el efecto de las poblaciones foliculares sobre las tasas de gestación en vaquillas receptoras de embriones. Cushman *et al.* (2009) encontraron una asociación entre bajas poblaciones foliculares y bajas tasas de gestación en vaquillas para carne, mientras Starbuck-Clemer *et al.* (2007) no encontraron relación entre la tasa de concepción y la población folicular en vaquillas y vacas para carne al comparar animales de alto y bajo número de folículos >4 mm de diámetro.

Se ha demostrado una correlación positiva entre la concentración de progesterona en vacas y su población folicular. Bajas concentraciones circulantes de progesterona se asocian con altas tasas de mortalidad de los embriones en el ganado bovino (Rhinehart *et al.*, 2009). En consecuencia, el ganado con una baja PF y bajas concentraciones de progesterona circulantes asociadas con un desarrollo disminuido del endometrio, también pueden tener menores tasas de gestación.

Mossa *et al.* (2012) evaluaron el número de folículos antrales a la inseminación en vacas Holstein, encontrando una asociación positiva ($p<0.05$) entre las PFs y su estatus reproductivo. Se obtuvieron bajas tasas de preñez al final de la época de empadre, mayores intervalos del destete a la concepción y un mayor número de servicios por concepción en vacas con baja PF comparadas con las de alta PF.

2.10 Literatura citada

- Acosta, T. J. 2007. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. *Journal of Reproduction and Development* 53: 39-44.
- Adams, G. P., R. L. Matteri, J. P. Kastelic, J. C. H. Ko, and O. J. Ginther. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 94: 177-188.
- Ax, R. L., S. Armbrust., R. Tappan, and G. Gilbert. 2005. Superovulation and embryo recovering from peripubertal Holstein heifers. *Animal Reproduction Science* 85: 71-80.
- Brad, K., and D. V. M. Stroud. 2005. Bovine fetal sexing using Ultrasound. *In Proceedings Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*: 341-348.
- Burns, D. S., F. Jimenez-Krassel, J. J. Ireland, P. G. Knight, and J. L. H. Ireland. 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction* 73: 54-62.
- Curtis, J. L. 1991. *Cattle Embryo Transfer Procedure, an Instructional Manual for the Rancher, Dairyman, Artificial Insemination Technician, Animal Scientist, and Veterinarian*. Academic Press. San Diego, California. 127 p.
- Cushman, R. A., J. C. DeSouza, V. S. Hedgpeth, and J. H. Britt. 1999. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. *Biology of Reproduction* 60: 349-354.
- Cushman, R. A., M. F. Allan, L. A. Kuehn, W. M. Snelling, A. S. Cupp, and H. C. Freetly. 2009. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbreed beef cows: Investigation of influence of stage of the estrus cycle, age, and birth weight. *Journal of Animal Science* 87: 1971-1980.
- Desjardins, C., and H. D. Hafs. Maturation of bovine female genitalia from birth through puberty. *Journal of Animal Science* 28: 502-507.
- Erickson, B. H. 1966. Development and senescence of postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science* 25: 800-805.
- Evans, A. C. O. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals* 38: 240-246.
- FAO. 1991. *Training Manual for Embryo Transfer in Cattle*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Publications Division. Rome, Italy. 164 p.

- Farin, P. W., and C. E. Farin. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biology of Reproduction* 52: 676-682.
- Gong, J. G., T. A. Bramley, I. Wilmut, and R. Webb. 1996. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* 3: 611-622.
- Gordon, I. 2004. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. 2nd ed. Cromwell Press, Trowbridge, UK. pp 230.
- Hansen, P. J. 2007. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology* 68: S242–S249.
- Hansen, P. J., and Fuquay, J. W. 2011. Heat Stress: effects on reproduction. *In Encyclopedia of Dairy Sciences*. Second edition Academic Press, Elsevier, London UK. pp: 567-574.
- Haugan, T., O. Reksen, Y. T. Grohn, E. Kommisrud, E. Ropstad, and E. Sehested. 2005. Seasonal effects of semen collection and artificial insemination on dairy cow conception. *Animal Reproduction Science* 90: 57–71.
- Hayakawa, H., T. Hirai, A. Takimoto, A. Ideta, and Y. Aoyagi. 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* 71: 68–73.
- Ireland, J. J., F. Ward, F. Jimenez-Krassel, J. L. H. Ireland, G. W. Smith, P. Lonergan, and A. C. O. Evans. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction* 22: 1687–1695.
- Ireland, J. L. H., D. Scheetz, F. Jimenez-Krassel, A. P. N. Themmen, F. Ward, P. Lonergan, G. W. Smith, G. I. Perez, A. C. O. Evans, and J. J. Ireland. 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of Reproduction* 79: 1219–1225.
- Jimenez-Krassel, F., J. K. Folger, J. L. H. Ireland, G. W. Smith, X. Hou, J. S. Davis, P. Lonergan, A. C. O. Evans, and J. J. Ireland. 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biology of Reproduction* 80: 1272–1281.
- King, W. A., L. Picard, D. Bousquet, and A. K. Goff. 1992. Sex-dependent loss of bisected bovine morulae after culture and freezing. *Journal of Reproduction and Fertility* 93 453-459.

- Kippax, I. S., W. B. Christie, and T. G. Rowan. 1991. Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on fetal survival in commercial bovine embryo transfer bisected embryos. *Theriogenology* 35: 25-35.
- Lopatarova, M., S. Cech, P. Krontorad, L. Holy, J. Hlavicova, and R. Dolezelex. 2008. Sex determination in bisected bovine embryos and conception rate after the transfer of female demi-embryos. *Veterinari Medicina* 53: 595–603.
- Lucy, M. C., J. D. Savio, L. Badinga, R. L. Sota, and W. W. Thatcher. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science* 70: 3615-3626.
- Mapletoft, R. J. 2006. Bovine embryo transfer. *In: Reviews in Veterinary Medicine*, IVIS. Ithaca: International Veterinary Information Service www.ivis.org. Consultada el 20 de mayo de 2010.
- McEvoy T. G., and J. M. Sreenan. 1990. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of zona pellucida-free cattle demi-embryos. *Theriogenology* 33: 1245-1253.
- Mossa, F., P. Duffy, S. Naitana, P. Lonergan, and A. C. O. Evans. 2007. Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes. *Animal Reproduction Science* 100: 391-396.
- Mossa, F., F. Jimenez-Krassel, S. Walsh, D. P. Berry, S. T. Butler, J. Folger, G. W. Smith, J. L. H. Ireland, P. Lonergan, J. J. Ireland, and A. C. O. Evans. 2010. Inherent capacity of the pituitary gland to produce gonadotropins is not influenced by the number of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 22: 550–557.
- Mossa, F., S. W. Walsh, S. T. Butler, D. P. Berry, F. Carter, P. Lonergan, G. W. Smith, J. J. Ireland, and A. C. O. Evans. 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95: 2355-2361.
- Nowshari, M. A., and W. Holtz. 1993. Transfer of split goat embryos without zonae pellucidae either fresh or after freezing. *Journal of Animal Science* 71: 3403-3408.
- Palma, G. A. 2001. *Bioteecnologías Reproductivas INTA*. Argentina. pp: 175-183.
- Peippo, J., K. Vartia, K. Kananen-Anttila, M. Raty, K. Korhonen, T. Hurmed, H. Myllymaki, A. Sairanen, and A. Maki-Tanila. 2009. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science* 111: 80–92.

- Pierson, R. A., and O. J. Ginther. 1986. Ovarian follicular populations during early pregnancy in heifers. *Theriogenology* 26: 649-659.
- Rawlings, N. C., A. C. O. Evans, A. Honaramooz, and P. M. Bartlewski. 2003. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Animal Reproduction Science* 78: 259–270.
- Reichelt, B., and H. Niemann. 1994. Generation of identical twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *Journal of Reproduction and Fertility* 100: 163-172.
- Reynolds, L. P., C. L. Ferrell, J. A. Nienaber, and S. P. Stephen. 1985. Effects of chronic environmental heat stress on blood flow and nutrient uptake by the uterus and fetus of the pregnant cow. Beef Research Program: Roman L. Hruska U.S. Meat Animal Research Center. Paper 38: 77-79.
- Rhinehart, J. D., M. J. Starbuck-Clemmer, A. Flores, R. A. Milvae, J. Yao, D. H. Poole, and E. K. Inskeep. 2009. Low peripheral progesterone and late embryonic/early fetal loss in suckled beef and lactating dairy cows. *Theriogenology* 71: 480-490.
- Rico, C., S. Fabre, C. Médigue, N. Di Clemente, F. Clément, M. Bontoux, J. Touzé, M. Dupont, E. Briant, B. Rémy, J. Beckers, and D. Monniaux. 2009. Anti-mülleriana hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biology of Reproduction* 80: 50–59.
- Sales, J. N. S., and J. C. Souza. 2005. Timing of artificial insemination and embryo production in superovulated Holstein cattle. *Animal Reproduction* 2 (3): 183-186.
- Sartori, R., R. Sartor-Bergfelt, and S. A. Mertens. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science* 85:2803–2812.
- Seidel, G.E. Jr. 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 68:443-446.
- Seike, N., K. Saeki, K. Utaka, M. Sakai, R. Takakura, Y. Nagao, and H. Kanagawa. 1989. Production of bovine identical twins via transfer of demi-embryos without zonae pellucidae. *Theriogenology* 89: 211-220.
- Shelton, J. N., and A. Szell. 1988. Survival of sheep demi-embryos in vivo and in vitro. *Theriogenology* 30: 865-863.
- Singh, J., M. Dominguez, R. Jaiswal, and G. P. Adams. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62: 227-243.
- Starbuck-Clemer, M. J., H. Hernandez-Fonceca, N. Ahmad, G. Seidel, and E. K. Inskeep. 2007. Association of fertility with numbers of antral follicles

- whiting a follicular wave during the oestrus cycle in beef cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 42: 337-342.
- Stewart, B. M., J. Block, P. Morelli, A. E. Navarette, M. Amstalden, L. Bonilla, P. J. Hansen, and T. R. Bilby. 2011. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *Journal of Dairy Science* 94: 3437–3445.
- Sunderland, S. J., M. A. Crowe, M. P. Boland, J. F. Roche, and J. J. Ireland. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 101: 547-555.
- Townson, D. H., P. C. Tsang, W. R. Butler, M. Frajblat, L. C. Griel, C. J. Johnson, R. A. Milvae, G. M. Niksic, and J. L. Pate. 2002. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *Journal of Animal Science* 80: 1053-1058.
- Van Vleck, L.D., E.J. Pollak, and E.A.B. Oltenacu. 1987. *Genetics for the Animal Sciences*. Freeman. New York, USA. 391 p.
- Warfield, S. J., G. E. Seidel Jr., and R. P. Elsden. 1987. Transfer of bovine demi-embryos with and without the zona pelucida. *Journal of Animal Science* 65: 756-761.
- Webb, J. R., and M. Drost. 1999. Commercial application of embryo transfer. In: *Large Dairy Herd Management*. 3rd Ed. Van Horn H. H. and Wilcox C. J. (eds.) American Dairy Science Association. Savoy IL. pp: 182-183.
- Webb, R., B. Nicholas, J. G. Gong, B. K. Campbell, C. G. Gutierrez, H. A. Garverick, and D. G. Armstrong. 2003. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction in Domestic Ruminants V. Suppl.* 61: 71–90.

3. POBLACIÓN FOLICULAR Y ÉPOCA EN LA EFICIENCIA DE UN PROGRAMA DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DIVIDIDOS EN VAQUILLAS HOLSTEIN

Meda Alducin Pedro, Rangel Santos Raymundo

3.1 Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la población de folículos (PF) ováricos ≥ 3 mm de vaquillas Holstein, en la producción de embriones en donadoras y características del celo y supervivencia embrionaria en receptoras, en épocas cálida y fría. Vaquillas entre 12 y 16 meses fueron examinadas en cuatro ocasiones, por ultrasonografía con un transductor lineal de 5 MHz para determinar la PF y fueron asignadas a uno de los siguientes tratamientos: A) PF Baja (≤ 4 folículos, $n = 10$) y B) PF Alta (≥ 5 folículos, $n = 9$) en donadoras y C) PF Baja (≤ 4 folículos, $n = 27$) y D) PF Alta (≥ 5 folículos, $n = 38$) en receptoras. Las donadoras fueron superovuladas, inseminadas con semen sexado y lavadas 8d después del servicio. Blastocitos de buena calidad fueron divididos y transferidos como uno ó dos hemiembriones en el cuerno ipsilateral al ovario con cuerpo luteo. En donadoras, las variables evaluadas fueron número de ovocitos (OVO), mórulas, blastocitos, embriones transferibles, embriones degenerados, y total de estructuras colectadas, en receptoras se evaluó la incidencia de celo, hora al celo, diámetro del folículo preovulatorio, incidencia de ovulación, diámetro del cuerpo lúteo y porcentaje de gestación (GEST). Se encontró un rango de 1 a 9 folículos en las vaquillas, con una repetibilidad ($p < 0.05$) de 0.24 época cálida y 0.66 en época fría. Las PF ni la época afectaron ($p > 0.05$) la producción de embriones u OVO en donadoras. En receptoras sólo GEST fue afectada ($p < 0.05$) por la transferencia de uno (27.8%) o dos hemiembriones (0%). La población folicular y la época no afectaron la producción de embriones en vaquillas Holstein donadoras ni las características del estro y supervivencia embrionaria de receptoras. La época del año afectó la repetibilidad de las PFs, La transferencia de uno o dos hemiembriones en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo afectó la supervivencia embrionaria.

Palabras clave: Población folicular, época del año, embriones divididos, estro, vaquillas Holstein .

Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Pedro Meda Alducin

Director de Tesis: Raymundo Rangel Santos, Ph.D.

FOLLICULAR POPULATION AND SEASON IN THE EFFICIENCY OF AN SPLIT EMBRYO TRANSFER PROGRAM IN HOLSTEIN HEIFERS

Meda Alducin Pedro, Rangel Santos Raymundo

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of the ovarian follicular population (FP) ≥ 3 mm of Holstein heifers in embryo production from donors and estrus characteristics and embryo survival in recipients during warm and cold seasons. Heifers between 12 and 16 months were examined in four occasions, by ultrasonography with a 5 MHz linear transducer to determine the follicular population and were assigned to one of the following treatments: A) FP Low (≤ 4 follicles, $n = 10$) and B) FP High (≥ 5 follicles, $n = 9$) in donor and C) FP Low (≤ 4 follicles, $n = 27$) and D) FP High (≥ 5 follicles, $n = 38$) in recipients. The donors were superovulated, inseminated with sexed semen and the embryos were recovered 8d after the service. Good quality blastocysts were divided and transferred as a hemiembryo or two hemiembryos in the ipsilateral horn to the ovary with the corpus luteum of each recipient. In donors, the variables evaluated were number of oocytes (OOC), morule, blastocysts (BLA), transferable embryos, degenerate embryos, and total structures collected (TSC). In recipients it was evaluated the incidence of estrus, time to estrous, diameter preovulatory follicle, incidence of ovulation, diameter of the corpus luteum and pregnancy rate (PR). We found a range from 1 to 9 follicles among animals, with a repeatability ($p < 0.05$) of 0.24 and 0.66 during warm and cold seasons respectively. Follicular population and season did not affect ($p > 0.05$) the embryos production or OOC from donors. In recipients only PR was affected ($p < 0.05$) by transferring one (27.8%) or two (0%) hemiembryos. In Holstein heifers follicular population and season did not affect the production of embryos from donors or the characteristics of estrus and embryonic survival in recipients, the season affects the repeatability of FP. Transferring of one or two hemiembryos in the ipsilateral horn to the corpus luteum affects embryo survival.

Key words: Follicular population, season, split embryos, estrous, Holstein heifers.

Master of Science Thesis, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Pedro Meda Alducin

Advisor: Raymundo Rangel Santos, Ph.D.

3.2 INTRODUCCIÓN

La evaluación de la población de folículos ováricos ha sido objeto de estudio en los últimos años tanto en humanos como en animales. En bovinos (Singhet *et al.*, 2004) y en ovinos (Mossa *et al.*, 2007) se sugiere que las altas poblaciones de folículos (PF) pueden tener un efecto positivo en la respuesta a tratamientos de superovulación incrementando el número de ovocitos para procedimientos de fertilización *in vitro* como un mayor número de embriones (Ireland *et al.*, 2007). La tasa de repetibilidad de la población de folículos antrales con diámetro de al menos 3 mm en vaquillas es alta (0.96, Burns *et al.*, 2005), y estudios recientes (Mossa *et al.*, 2012) asocian la baja fertilidad en ganado lechero con bajo número de folículos antrales ≥ 3 mm de diámetro. Cushman *et al.* (2009) estudiando ganado productor de carne, estimaron que la PF es constante entre ondas foliculares, lo cual que permite la identificación de individuos con poblaciones foliculares altas incrementa la posibilidad de tener éxito al identificar hembras con habilidad sobresaliente en la producción de embriones y en la fertilidad de receptoras.

En la sincronización de estros, el uso del dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR) y prostaglandinas, es uno de los protocolos más usados en hatos lecheros. Con el CIDR la incidencia del estro en vaquillas puede ser alta durante los primeros días de finalizado el protocolo. Sin embargo, una de las principales razones para la exclusión de animales de experimentos es la falta de manifestación de celos.

El efecto detrimental del estrés calórico sobre la reproducción de ganado lechero es ampliamente reconocido, y una de las estrategias más efectivas para mejorar la fertilidad de vacas lactantes expuestas a estrés calórico es la transferencia de embriones, la cual puede tener mejores resultados al utilizar embriones divididos con lo que se puede incrementar así el porcentaje de gestaciones en hasta un 142%. Desarrollar alternativas que conlleven a reducir

la variabilidad de la respuesta a tratamientos de superovulación e incrementar la producción de embriones, así como una adecuada sincronización del estro es una de las principales metas para incrementar el comportamiento reproductivo en hatos lecheros. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la población de folículos ováricos ≥ 3 mm de vaquillas Holstein, en la producción de embriones en donadoras y características del celo y supervivencia embrionaria en receptoras en épocas cálida y fría.

3.3 MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

El experimento se realizó en el establo lechero de la Unidad de Producción 18 de Julio propiedad de la Cooperativa Agropecuaria y Forestal Chapingo, ubicado en el municipio de Tlahualilo, Durango, entre las coordenadas 25° 54' 07'' latitud norte y 103° 35' 09'' longitud oeste. La altura sobre el nivel del mar es de 1137 m, con clima seco árido. La temperatura media anual es de 21.1 °C con una precipitación pluvial de 239 mm anuales, distribuida principalmente en los meses de julio a septiembre (García, 1988). Los programas de transferencia de embriones fueron realizados del 29 de julio a 16 de agosto (época cálida) y del 1 al 19 de diciembre del 2010 (época fría) presentando índices de temperatura y humedad (ITH) por época de 74 y 54, respectivamente.

Animales y ultrasonografía

En épocas cálida y fría se escanearon con un equipo de ultrasonido (Sonovet 2000, Madison Wisconsin) equipado con un transductor rectal de 5 MHz, 74 vaquillas Holstein vírgenes de entre 12 y 16 meses de edad, para determinar su población de folículos ováricos ≥ 3 mm de diámetro. Cada ovario fue escaneado para identificar la posición del cuerpo lúteo y de los folículos antrales. Todas las revisiones fueron realizadas por el mismo técnico.

La población folicular se definió por el número de folículos de diámetro de 3 o más mm en ambos ovarios, considerándose tanto los folículos en fases de crecimiento como los atrésicos. Para determinar la repetibilidad de la población individual de folículos, cada vaquilla fue revisada en cuatro ocasiones previas al inicio de la sincronización de estros (día cero o inserción del CIDR), con intervalo de 10 días entre cada revisión. El promedio de folículos encontrados en las revisiones se consideró como la población folicular individual y fue utilizada para ser asignadas a uno de los tratamientos correspondientes.

Diseño experimental

Las vaquillas utilizadas como donadoras (n=19) fueron asignadas a uno de los siguientes tratamientos: A) PF alta (≥ 5 folículos, n=9), y B) PF baja (≤ 4 folículos, n=10) acorde a las épocas cálida (EC) fría (EF) en las que se realizó el estudio. Las vaquillas restantes (n= 65) fueron sincronizadas como receptoras de embriones distribuyéndose en los siguientes tratamientos: A) PF alta (≥ 4 folículos, n=23), y B) PF baja (≤ 4 folículos, n=42) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Distribución de las vaquillas en el estudio por población folicular y época del año.

Vaquillas	Población Folicular	Época cálida (n)	Época fría (n)
Donadoras	Alta	5	4
	Baja	5	5
Receptoras	Alta	16	7
	Baja	17	25

Programa de transferencia de embriones

Los programas de transferencia de embriones divididos (TEd) incluyen las siguientes actividades: selección de reproductores (donadoras y receptoras), sincronización de celos, superovulación, servicio a las donadoras, recolección de embriones, división y transferencia de embriones a receptoras. El protocolo utilizado se muestra en la Figura 2.

Sincronización del estro y superovulación

La sincronización del estro de las vaquillas se realizó mediante la aplicación de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) (Benzoato de Estradiol, Synex) el día inicial (día cero) y la inserción de un dispositivo intravaginal conteniendo 1.9 g de progesterona (CIDR, Pfizer) durante ocho días. El día 8 a las 8:00 h se retiró el dispositivo intravaginal y se aplicaron vía intramuscular 500 μ g de Cloprostenol (Celosil, Schering Plough). La detección de celos se realizó permanentemente a

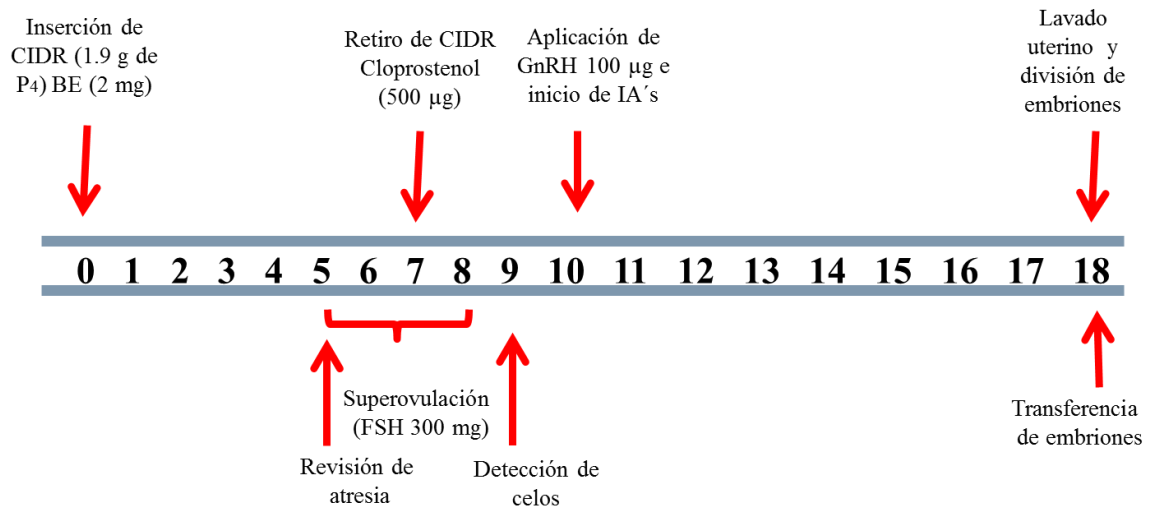


Figura 2. Actividades en el protocolo de transferencia de embriones.

partir de 24 h después de retirar el dispositivo intravaginal. La superovulación se llevó a cabo del día cinco al día ocho de la sincronización, las vacas recibieron 300 mg de hormona folículo estimulante (, Folltropin-V Bioniche.) aplicando ocho dosis con un intervalo de 12 h entre aplicaciones en un protocolo descendente (60, 60, 50, 50, 30, 30, 10, 10 mg). Las donadoras fueron inseminadas a las 12, 18 y 24 h posteriores a la detección del celo, aplicando media dosis de semen sexado (2×10^6 de espermatozoides) por servicio en la parte media de cada cuerno uterino. Se utilizó semen comercial, con lote y fertilidad conocidas, y de un solo semental.

Recolección y división de embriones

Los embriones fueron colectados entre el día 7 y 7.5 después de la inseminación, utilizando procedimientos no quirúrgicos y una solución de PBS (Solución salina fosfato buferada) modificada, utilizando un catéter Foley (No. 18) lavando cada cuerno uterino en forma independiente. Los embriones fueron recuperados en un filtro Emcon con malla de 80 micras; posteriormente se determinó su calidad con ayuda de un microscopio estereoscópico, tomando en consideración sus características morfológicas y su estadio de desarrollo. Solo

los blastocitos de excelente calidad fueron divididos utilizando procedimientos estándares, con ayuda de un micromanipulador, un microscopio invertido y una micronavaja.

Sincronización de estro en vaquillas receptoras y transferencia de embriones

La sincronización del estro en las receptoras se realizó bajo el mismo esquema que en las donadoras, con la diferencia de que la aplicación de prostaglandinas se realizó el día siete a las 19:00 h. La TE se llevó a cabo inmediatamente después de clasificar (y dividir según el caso) los embriones mediante un método no quirúrgico, colocándose un medio embrión (hemiembrión), dos medios embriones, un blastocito o una mórula, en el tercio medio del cuerno ipsilateral al ovario donde se encontró el cuerpo lúteo (CL) en cada receptora. Para la TE se aplicó un bloqueo epidural con 5 mL de lidocaína al 2% (Servacaína, Intervet) por receptora, y fue realizada por el mismo técnico en las dos épocas del año. La detección de preñez se realizó 45 d posteriores a la TE con ayuda de un equipo ultrasonografico.

Alimentación de las vaquillas

Las vaquillas fueron alimentadas *ad libitum* en 2 ocasiones diarias (08:00 y 18:00 h), con una dieta a base de heno de avena, pasta de soya, salvado de trigo, ensilaje de maíz y suplementos minerales así como agua limpia *ad libitum*.

Variables evaluadas

Para determinar el efecto de las poblaciones foliculares en épocas cálida y fría, se registraron las siguientes variables: la población folicular, y la repetibilidad individual en todas las vaquillas, en vaquillas donadoras la incidencia de celo, horas al celo, número de ovocitos, mórulas, blastocitos, embriones transferibles, embriones degenerados y estructuras totales colectadas; mientras en las vaquillas receptoras las variables registradas fueron la incidencia de celo, horas

al celo, diámetro del folículo preovulatorio, diámetro del cuerpo lúteo presente siete d después del celo y el porcentaje de gestación 45 d post-transferencia.

La incidencia de celo se determinó al detectar que las vaquillas fueron montadas por más de 10 segundos. Se consideró como horas al celo, las horas transcurridas de la remoción del CIDR y aplicación de prostaglandinas a la primera monta.

El número de embriones transferibles se definió como el número de blastocitos y el número de mórulas cuya calidad fue considerada apta para transferirse. Embriones degenerados fueron aquellos que en algún estadio de desarrollo no continuaron su crecimiento, así como los embriones de calidad no transferible. Las estructuras totales colectadas fue la suma del número de embriones y de ovocitos.

Durante las épocas cálida y fría se registraron las temperaturas máxima, mínima y humedad relativa durante los días comprendidos de la sincronización a la TE para realizar el cálculo del índice de temperatura y humedad (ITH). El ITH fue calculado utilizando la temperatura media (TM) y la humedad relativa (HR) tomadas los días del estudio, con la siguiente ecuación $(1.8 \times TM + 32) - (0.55 - (0.0055 \times HR)) \times (1.8 \times TM - 26.8)$ (Fuquay *et al.*, 2011). Se encontró un ITH de 74.6 durante la época cálida y de 54.7 para la época fría.

Análisis Estadístico

Las variables respuesta en donadoras fueron sometidas a una prueba de Shapiro-Wilks para el análisis de normalidad de los datos mediante el procedimiento UNIVARIATE del paquete estadístico computacional SAS (9.0, 2002); al verificar que los datos no mostraron una distribución normal, fueron analizadas en un diseño experimental factorial 2x2 con ayuda del procedimiento para variables categóricas (CATMOD) del mismo paquete estadístico computacional.

En las vaquillas receptoras, las variables hora al celo, diámetro del folículo preovulatorio y diámetro del cuerpo lúteo fueron analizadas con el procedimiento GLM, mientras que las variables incidencia de celo, incidencia de ovulación y gestación se analizaron mediante pruebas de Chi cuadrada (χ^2) con el procedimiento FREQ del paquete estadístico SAS (9.0, 2002).

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + P_i + E_j + P \cdot E_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: y_{ij} es la respuesta en la i -ésima población folicular con la j -ésima vaquilla; μ es la media general de las vaquillas; P_i es el efecto de la i -ésima población folicular (1= Alta, 2= Baja); E_j es el efecto de la i -ésima época del año (1=Cálida, 2=Fría); PE_{ij} es el efecto de la interacción de la i -ésima población folicular y la i -ésima época del año y ε_{ijk} es el error experimental.

La repetibilidad (rango de 0-1, 1 es perfecta) es definida como la proporción del total de la varianza atribuida a la varianza animal calculada de la siguiente manera: $\sigma^2 \text{ animal} / (\sigma^2 \text{ animal} + \text{error de } \sigma^2)$ (Boni *et al.*, 1997).

3.4 Resultados y discusión

Población folicular

El rango de folículos ováricos en las vaquillas del estudio fue de uno a nueve y una repetibilidad ($p < 0.05$) de 0.24 y 0.66 en épocas cálida y fría. Las vaquillas ($n=19$) con el número promedio de folículos más divergentes (Figura 3) fueron seleccionadas como donadoras, las restantes 65 fueron sincronizadas como receptoras de embriones, ambos grupos en dos épocas diferentes.

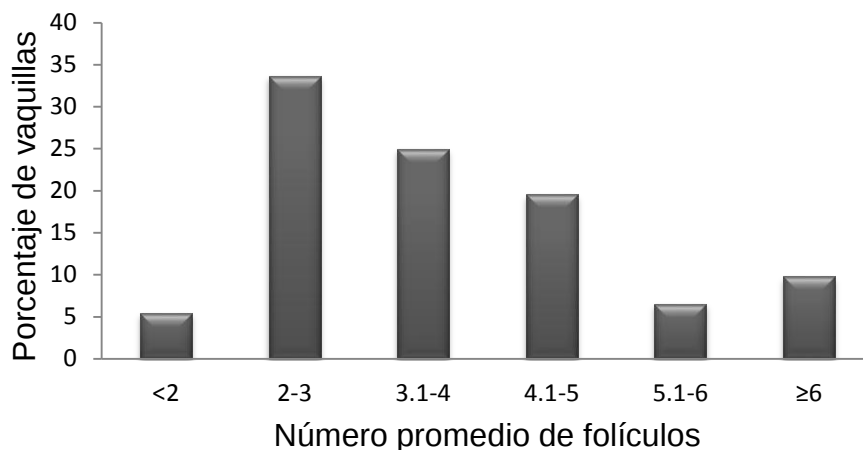


Figura 3. Distribución del promedio de folículos ováricos ≥ 3 mm de vaquillas Holstein vírgenes escaneadas mediante ultrasonografía cuatro veces a intervalos de 10 d.

El rango de folículos del estudio concuerda con el reportado por Oliveira *et al.* (2002) en vacas *Bos indicus* ciclando, con alta y baja fertilidad, obteniendo un promedio de 0.5 a 5.8 folículos >5 mm. De manera similar Starbuck-Clemer *et al.* (2007) reportaron un promedio de 4.4 folículos ≥ 4 mm con una repetibilidad de 0.05 a 0.5 en ganado bovino productor de carne con dos o tres ondas foliculares durante la época de empadre. Sin embargo, la mayoría de los estudios difieren con los resultados reportados en el presente estudio. Burns *et al.* (2005) encontraron un rango de 8 a 42 folículos ≥ 3 mm con una repetibilidad individual de 0.92 en vaquillas Holstein, a su vez estudios recientes en vaquillas productoras de carne (Ireland *et al.*, 2007) han presentado rangos de 9 a 45 folículos ≥ 3 mm y una repetibilidad promedio de 0.85.

Singh *et al.* (2004) encontraron una fuerte relación entre el número de folículos >2 mm en la última onda folicular y el número de folículos al final del tratamiento superovulatorio en vacas. En ovejas, Mossa *et al.* (2007), reportaron un incremento del total de estructuras colectadas en ovejas con PF >8 en comparación a ovejas con <8 folículos (8.0 vs 4.2).

En bovinos, el número de folículos ováricos puede ser un predictor de la respuesta a tratamientos de superovulación para la obtención de embriones *in vivo* (Ireland *et al.*, 2007) así como en ciclos de aspiración folicular (Singh *et al.*, 2004).

La causa de la variabilidad de folículos del presente estudio como de estudios previos es desconocida, sin embargo, puede deberse a factores como el número de folículos primordiales desde el nacimiento (Erickson, 1966), mecanismos genéticos, concentraciones hormonales (Jimenez-Krassel *et al.*, 2009; Mossa *et al.*, 2010), nutrición materna (Evans *et al.*, 2010), factores medio ambientales o al equipo ultrasonográfico utilizado.

Respuesta en donadoras

La población folicular en vaquillas Holstein donadoras de embriones determinada antes de la remoción del CIDR no afectó ($p>0.05$) la incidencia del celo (100% en ambos grupos) y horas al celo (baja PF= 39.5 ± 2.9 vs alta PF= 42.8 ± 3.8). La época del año no afectó la incidencia del celo (100% en ambos grupos) y horas al celo (época cálida= 38.5 ± 3.1 vs época fría= 43.9 ± 3.3) de los grupos. Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado información publicada para comparar los resultados con otras investigaciones. Estudios en vacas lecheras y vaquillas para producción de carne, han reportado concentraciones similares de estradiol a través del ciclo estral en grupos de animales con alta y baja población folicular (Ireland *et al.*, 2007; Mossa *et al.*, 2010), lo cual podría explicar parcialmente los resultados obtenidos.

En vaquillas Holstein, la población folicular, la época del año ni su interacción, afectaron ($p>0.05$) el número de ovocitos (OVO), número de mórulas (MOR), blastocitos (BLA), embriones transferibles (ET), embriones degenerados (DEG), y estructuras totales colectadas (TOEC) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estructuras colectadas de vaquillas donadoras con alta (APF) o baja (BPF) población folicular durante épocas cálida (EC) y fría (EF) y su interacción.

Variable	n	TOEC (n)	BLA (%)	MOR (%)	ET ^z (%)	DEG (%)	OVO (%)	PEC ^y
APF	9	60	21.7	15.0	36.7	11.7	51.7	6.6 ± 2.3
BPF	10	71	39.4	7.0	46.5	11.3	42.3	7.1 ± 2.2
EC	10	83	28.9	12.0	41.0	8.4	50.6	8.3 ± 1.7
EF	9	48	35.4	8.3	43.8	16.7	39.6	5.3 ± 2.0
APF x EC	5	42	14.3	19.0	33.3	7.1	59.5	8.4 ± 1.5
APF x EF	4	18	38.9	5.6	44.4	22.2	33.3	4.5 ± 1.7
BPF x EC	5	41	43.9	4.9	48.8	9.8	41.5	8.2 ± 3.2
BPF x EF	5	30	33.3	10.0	43.3	13.3	43.3	6.0 ± 3.3

^z Suma de blastocitos y mórulas. ^y ± error estándar. OVO= ovocitos, MOR= mórulas, BLA= blastocitos, ET= embriones transferibles, DEG= embriones degenerados, TOEC= total de estructuras colectadas, PEC= Promedio de estructuras colectadas.

No se han encontrado publicaciones para comparar los resultados del presente estudio evaluando el efecto de la población folicular en la respuesta a tratamientos de superovulación de vaquillas Holstein en diferentes épocas del año inseminadas con semen sexado. Kawamata (1994) en un estudio con vacas Holstein sometidas a un programa de TE, reportó que a mayor número total de folículos de 3-6 mm de diámetro en ambos ovarios se incrementó ($r = 0.44$, $p < 0.001$) el número de TOEC y de ET.

La diferencia numérica observada en el porcentaje de BLA (39.4 vs 21.7%) y ET (46.5 vs 36.7) de las vaquillas con baja PF respecto a las de alta PF, concuerda con lo reportado por Ireland *et al.* (2007) en el porcentaje de ET (79.8 vs 50.7) en vaquillas productoras de carne. Los autores también reportaron diferencias ($p < 0.05$) en el promedio de DEG (9.1 vs 26.9) y TOEC (4.7 vs 10.6) entre grupos de vaquillas con baja y alta población folicular. En forma similar Mossa *et al.* (2007) reportaron en ovejas con alta población folicular (>8 folículos) mayor TOEC (8.4 vs 4.7, $p = 0.15$), ETR (8.0 vs 4.2, $p = 0.016$) y número de embriones de buena calidad (7.8 vs 3.6, $p = 0.01$) en contraste a ovejas con baja población folicular (<8 folículos).

En el presente estudio el porcentaje de OVO tendió a ser mayor en las vaquillas con alta PF, lo que concuerda con lo reportado por Ireland *et al.* (2007) y Mossa *et al.* (2007). Sin embargo, los autores lo atribuyen a una mayor colecta de estructuras de los animales con alta PF, lo que puede ocasionar un mayor número de OVO en comparación con los de baja PF. Sartori *et al.* (2002) reportaron en vaquillas y vacas inseminadas y lavadas cinco d después, un 100% de fertilización de ovocitos de vaquillas en verano, siendo la calidad embrionaria similar a la de vacas secas lavadas en invierno y mejor que la de vacas lactantes lavadas en verano e invierno.

En las tres inseminaciones con semen sexado se depositaron aproximadamente 6×10^6 espermatozoides, y se obtuvo un porcentaje promedio similar de ET y OVO (42 y 46.6%) entre vaquillas con alta y baja PF. Los resultados difieren de los encontrados con Peippo *et al.* (2009), quienes reportaron 53.9 y 21.1% de ET y OVO, al inseminar vaquillas lecheras con dos a cuatro dosis de semen sexado. Por su parte, Hayakawa *et al.* (2009) encontraron menor porcentaje de ET (36) con respecto al de OVO (51.1) al inseminar vaquillas con una sola dosis de 5×10^6 espermatozoides de 18-24 h después de la detección del estro. Resultados similares los encontraron Schenk *et al.* (2006) al obtener 32% de ET y 51% de OVO al inseminar con una dosis de 2×10^6 espermatozoides de semen sexado 72 h después de la última aplicación de prostaglandinas. En general las investigaciones nos indican que la dosis de semen utilizada y el momento de la inseminación son factores importantes a considerar en la planeación de un programa de TE.

Estudios en humanos (Ré *et al.*, 2009), han reportado que el recuento de folículos antrales al igual que la determinación de concentraciones de hormona anti-mülleriana son un buen predictor de la respuesta a tratamientos superovulatorios, siendo un método con poder predictivo de la respuesta ovárica comparable e incluso superior a comparar las concentraciones de FSH y estradiol.

3.5 Respuesta en receptoras

La población folicular no afectó ($p > 0.05$) la incidencia de celos (IC), hora al celo (HC), diámetro del folículo preovulatorio (DFP), incidencia de ovulación (IO) y diámetro del cuerpo lúteo (DCL). El porcentaje de gestación (GEST) presentó diferencias ($p < 0.05$) entre las épocas cálida y fría (Cuadro 3), sin embargo, se ha atribuido este efecto al tipo de transferencia realizada (uno o dos hemiembriones en el cuerno ipsilateral al ovarios donde se encontró el cuerpo lúteo).

Cuadro 3. Características del estro y porcentaje de gestación (Gest) de vaquillas sincronizadas con alta (APF) o baja (BPF) población folicular durante épocas cálida (EC) y fría (EF) y su interacción.

Variable	VS (n)	IC (%)	HC	DFP (mm)	IO (%)	CL (mm) ^y	VT (n)	Gest (%)
APF	24	79.2	73.6 ± 4.8	12.6 ± 0.4	79.2	15.3 ± 0.3	15	12.5
BPF	40	80.0	68.1 ± 2.4	12.7 ± 0.4	80.0	14.7 ± 0.2	18	15.8
EC	33	78.8	75.4 ± 3.8	12.7 ± 0.3	75.8	15.6 ± 0.3	18	27.8 ^a
EF	31	80.6	67.1 ± 3.1	12.3 ± 0.3	80.6	15.4 ± 0.4	15	00.0 ^b
APF x EC	15	85.7	68.9 ± 6.1	13.3 ± 0.4	85.7	16.2 ± 0.3	9	22.2
APF x EF	9	77.8	56.6 ± 3.8	12.4 ± 0.6	83.3	15.1 ± 0.4	6	00.0
BPF x EC	18	83.3	72.6 ± 4.2	12.6 ± 0.4	77.8	14.8 ± 0.2	9	33.3
BPF x EF	22	81.8	70.4 ± 1.3	12.2 ± 1.6	81.8	15.6 ± 0.2	9	00.0

Valores con diferente literal dentro de una hilera presentan diferencias significativas entre tratamientos ^{a, b} ($p < 0.05$). ^z ± error estándar. ^y CL de las vaquillas que ovularon. VS= vaquillas sincronizadas, IC= incidencia de celos, HC= horas al celo, DPF= diámetro del folículo preovulatorio, IO= incidencia de ovulación, CL= cuerpo lúteo, VT= vaquillas transferidas.

El diámetro del folículo preovulatorio no difirió entre las poblaciones foliculares, resultados similares reportaron Mossa *et al.* (2010) quienes no encontraron diferencias ($p > 0.05$) en el DFP de vacas con alta PF (17.6) en comparación a vacas con baja PF (20.5). Sin embargo, no existen estudios que comparen las características del estro entre grupos de vaquillas con poblaciones foliculares divergentes o los respectivos DFP y DCL.

Starbuck-Clemer *et al.* (2007) reportaron en ganado productor de carne, que el número de folículos antrales no afecta la fertilidad del ovocito liberado por el folículo dominante al momento de la inseminación en base a la tasa de

concepción de vacas y vaquillas. Investigaciones previas (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007) reportan concentraciones basales de estradiol similares ($p>0.05$) entre grupos de vaquillas con alta y baja PF. Sin embargo, Ireland *et al.* (2009) encontraron una concentración dos veces mayor de estradiol intrafolicular en vaquillas con baja PF, lo cual puede ocasionar efectos detrimentales en la maduración del ovocito que conlleven a fallas de fertilización o desarrollo embrionario. Jimenez-Krassel *et al.* (2009) reportaron un mayor crecimiento endometrial hasta 4 d posteriores a la ovulación y mayores concentraciones de progesterona en la fase lútea del ciclo estral en ganado productor de carne con alta PF en contraste con animales de baja PF. Ambos grupos presentaron cuerpos lúteos de tamaño promedio similar, lo que pudiese comprometer el mantenimiento de la preñez (Rhinehart *et al.*, 2009) por lo cual ganado con baja PF pudiera tener una baja fertilidad. En el presente estudio no se realizaron determinaciones hormonales para contrastar los trabajos previos.

Se encontraron diferencias ($p<0.05$) entre el tipo de transferencia realizada en el cuerno ipsilateral a la ubicación del cuerpo lúteo. La transferencia de un hemiembrión generó una mayor supervivencia embrionaria (27.8%) en comparación con la transferencia de dos hemiembriones (0.0%) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tipo de embrión transferido y porcentaje de gestación en vaquillas Holstein.

Tipo de embrión transferido ^z	Receptoras transferidas (n)	Receptoras gestantes (n)	Porcentaje de gestación
Un Hemiembrión	18	5	27.8 ^a
Dos Hemiembriones	14	0	0.0 ^b

Valores con diferente literal dentro de una hilera presentan diferencias significativas entre tratamientos ^{a, b} ($p<0.05$). ^z La transferencia de un hemiembrión se realizó en época cálida y la de dos hemiembriones en época fría.

Baker *et al.* (1985) y Warfield *et al.* (1987) reportaron un porcentaje de gestación similar al obtenido en el presente estudio al transferir un hemiembrión

(30 y 33%), sin embargo, no concuerda con lo reportado al transferir dos hemiembriones (52 vs 30%). Nuestros resultados difieren de la mayoría de estudios previos con embriones frescos producidos *in vivo* divididos. Williams *et al.* (1984) evaluaron la calidad del estadio de desarrollo y el tiempo al lavado en embriones divididos sobre la tasa de gestación, reportando un 54% de gestaciones al dividir y transferir medio blastocito con calidad similar a los utilizados en el presente estudio. Ozil (1983) obtuvo 36.9% de preñez al transferir un hemiembrión en contraste con un 72.7% al transferir los dos hemiembriones. De manera similar, Lopatarova *et al.* (2008) transfirieron embriones frescos divididos y sexados de vacas Holstein a vaquillas de la misma raza, reportando diferencias ($p<0.05$) al transferir 2 mitades de manera bilateral o una mitad ipsilateral (56.5 vs 48.8%) al cuerpo lúteo. King *et al.* (1992) dividieron mórulas de vaquillas Holstein, las cuales cultivaron en oviductos de ovejas por 24 h hasta alcanzar etapas de mórulas avanzadas o blastocitos, con lo que obtuvieron un promedio de gestación de 27.7% para medios embriones sexados como machos y 43.7% en embriones sexados como hembra.

Considerando que los 18 medios embriones transferidos provenían de 9 embriones que generaron 5 gestaciones, se obtuvo un 55.5% de gestaciones en proporción a los embriones originales.

Investigaciones y programas comerciales de TE frescos divididos reportan altas tasas de obtención de fetos/embrión al transferir un medio embrión (113%, Kippax *et al.*, 1991; 142%, Seike *et al.*, 1989) comparativamente con la transferencia de dos medios embriones por vaquilla (87%, Lopatarova *et al.*, 2008; 90%, Kippax *et al.*, 1991).

Reichenbach *et al.* (1992) al transferir embriones completos en vaquillas SimentalxHolstein, no encontraron diferencias ($p>0.05$) en las tasas de gestación al transferir de manera unilateral uno (47%) o dos (49%) embriones

producidos *in vitro*. Sin embargo, Franco *et al.* (2006) al transferir embriones producidos *in vitro* en vaquillas en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo reportaron una menor tasa de gestación al transferir dos embriones (20%) en comparación a transferir uno (41%) en época de estrés calórico. Los autores consideraron la limitada capacidad uterina de las vaquillas como un factor que puede afectar el mantenimiento y desarrollo fetal de dos gestaciones.

Se desconocen las causas por las que en el presente estudio se obtuvo una nula tasa de concepción al transferir dos medios embriones, sin embargo, las tasas de preñez en programas de TE divididos pueden variar dependiendo de algunos factores como la técnica de división (Seike *et al.*, 1989), la edad y estado de desarrollo del embrión (Williams *et al.*, 1984), así como la transferencia de uno o dos medios embriones (Lopatarova *et al.*, 2008) o embriones completos (Franco *et al.*, 2006).

3.6 Conclusiones

La población folicular y la época del año no afectaron la producción de embriones en vaquillas Holstein usadas como donadoras ni las características del estro y supervivencia embrionaria de receptoras. La época del año afectó la repetibilidad de las PFs. La transferencia de uno o dos hemiembriones en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo afectó la supervivencia embrionaria.

3.7 LITERATURA CITADA:

- Baker, R. D. 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology* 23: 3-12.
- Boni, R., M. W. M. Roelofsen, M. C. Pieterse, J. Kogut, and T. A. M. Kruip. 1987. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology* 48: 277-289.
- Burns, D. S., F. Jimenez-Krassel, J. J. Ireland, P. G. Knight, and J. L. H. Ireland. 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction* 73: 54-62.
- Cushman, R. A., M. F. Allan, L. A. Kuehn, W. M. Snelling, A. S. Cupp, and H. C. Freetly. 2009. Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows. *Journal of Animal Science* 87: 1971-1980.
- Erickson, B. H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science* 25: 800-805.
- Evans, A. C. O., F. Mossa, T. Fair, P. Lonergan, G. W. Smith, F. Jimenez-Krassel, J. K. Folger, J. L. H. Ireland, and J. J. Ireland. 2010. Variation in the number of ovarian follicles in cattle: possible causes and consequences. *Acta Scientiae Veterinariae* 38 (2): 537-543.
- Franco, M., J. Block, F. D. Jousan, L. A. de Castro e Paula, A. M. Brad, J. M. Franco, F. Grise, R. L. Monson, J. J. Rutledge, and P. J. Hansen. 2006. Effect of transfer of one or two in vitro-produced embryos and post-transfer administration of gonadotropin releasing hormone on pregnancy rates of heat-stressed dairy cattle. *Theriogenology* 66: 224-233.
- Fuquay, J. W., P. F. Fox, and P. L. H. McSweeney. 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Second edition Academic Press, Elsevier, London UK. pp: 561.
- García, E. 1988. Modificaciones del Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Universidad Nacional Autónoma de México. pp: 105-108.
- Hayakawa, H., T. Hirai, A. Takimoto, A. Ideta, and Y. Aoyagi. 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* 71: 68-73.
- Ireland, J. J., F. Ward, F. Jimenez-Krassel, J. L. H. Ireland, G. W. Smith, P. Lonergan, and, A. C. O. Evans. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction* 22: 1687-1695.

- Ireland, J. J., A. E. Zielak-Steciwko, F. Jimenez-Krassel, J. Folger, A. Bettegowda, D. Scheetz, S. Walsh, F. Mossa, P. G. Knight, G. W. Smith, P. Lonergan, and A. C. O. Evans. 2009. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biology of Reproduction* 80: 954-964.
- Jimenez-Krassel, F., J. K. Folger, J. L. H. Ireland, G. W. Smith, X. Hou, J. S. Davis, P. Lonergan, A. C. O. Evans, and J. J. Ireland. 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biology of Reproduction* 80: 1272–1281.
- Kawamata, R. 1994. Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. *Journal Veterinary and Medical Science* 56: 965- 967.
- King, W. A., L. Picard, D. Bousquet, and A. K. Goff. 1992. Sex-dependent loss of bisected bovine morulae after culture and freezing. *Journal of Reproduction and Fertility* 93: 453-459.
- Kippax, I. S., W. B. Christie, and T. G. Rowan. 1991. Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on fetal survival in commercial bovine embryo transfer bisected embryos. *Theriogenology* 35: 25-35.
- Lopatarova, M., S. Cech, P. Krontorad, L. Holy, J. Hlavicova, and R. Dolezelex. 2008. Sex determination in bisected bovine embryos and conception rate after the transfer of female demi-embryos. *Veterinarni Medicina* 53: 595–603.
- Mossa, F., P. Duffy, S. Naitana, P. Lonergan, and A. C. O. Evans. 2007. Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes. *Animal Reproduction Science* 100: 391-396.
- Mossa, F., F. Jimenez-Krassel, S. Walsh, D. P. Berry, S. T. Butler, J. Folger, G. W. Smith, J. L. H. Ireland, P. Lonergan, J. J. Ireland, and A. C. O. Evans. 2010. Inherent capacity of the pituitary gland to produce gonadotropins is not influenced by the number of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 22: 550–557.
- Mossa, F., S. W. Walsh, S. T. Butler, D. P. Berry, F. Carter, P. Lonergan, G. W. Smith, J. J. Ireland, and A. C. O. Evans. 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95: 2355-2361.
- Oliveira, J. F. C., J. P. Neves, J. C. F. Moraes, P. B. D. Gonçalves, J. M. Bahr, A. G. Hernandez, and L. F. S. Costa. 2002. Follicular development and

- steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. *Animal Reproduction Science* 73: 1–10.
- Ozil, J. P. 1983. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 69: 463-468.
- Peippo, J., K. Vartia, K. Kananen-Anttila, M. Raty, K. Korhonen, T. Hurmed, H. Myllymaki, A. Sairanen, and A. Maki-Tanila. 2009. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science* 111: 80–92.
- Ré, I., I. Serpa, A. Lima, C. López, S. Gersevich, F. All, G. Botti, y C. Morente. 2009. Reproducibilidad intercíclica de la hormona anti-mülleriana y su correlación con folículos antrales, FSH y estradiol. *Reproducción* 24:128-134.
- Reichenbach, J. Liebrich, U. Berg and G. Brem. 1992. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 95: 363-370.
- Rhinehart, J. D., M. J. Starbuck-Clemmer, A. Flores, R. A. Milvae, J. Yao, D. H. Poole, and E. K. Inskeep. 2009. Low peripheral progesterone and late embryonic/early fetal loss in suckled beef and lactating dairy cows. *Theriogenology* 71: 480-490.
- Sartori, R., R. Sartor-Bergfelt, and S. A. Mertens. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science* 85: 2803–2812.
- SAS. 2002. SAS/STAT User's Guide. (Release 9.1). SAS Publishing. Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Schenk, J. L., T. K. Suh, and G. E. Seidel, Jr. 2006. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology* 65: 299-307.
- Seike, N., K. Saeki, K. Utaka, M. Sakai, R. Takakura, Y. Nagao, and H. Kanagawa. 1989. Production of bovine identical twins via transfer of demi-embryos without zonae pellucidae. *Theriogenology* 89: 211-220.
- Singh, J., M. Dominguez, R. Jaiswal, and G. P. Adams. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62: 227-243.
- Starbuck-Clemer, M. J., H. Hernandez-Fonceca, N. Ahmad, G. Seidel, and E. K. Inskeep. 2007. Association of fertility with numbers of antral follicles within a follicular wave during the oestrus cycle in beef cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 42: 337-342.

- Warfield, S. J., G. E. Seidel, Jr., and R. P. Elsdon. 1987. Transfer of bovine demi-embryos with and without the zona pelucida. *Journal of Animal Science* 65: 756-761.
- Williams, T. J., R. P. Elsdon, and G. E. Seidel, Jr. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology* 26: 521-535.