

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE Y VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINOS DIVIDIDOS

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

CHRISTOFER ISRAEL MÁRQUEZ HERNÁNDEZ

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



DIRECCIÓN GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Chapingo, Estado de México, Junio de 2011

SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE Y VIABILIDAD DE
EMBRIONES BOVINOS DIVIDIDOS

Tesis realizada por CHRISTOFER ISRAEL MÁRQUEZ HERNÁNDEZ 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: RAYMUNDO RANGEL S.
Ph.D. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

ASESOR: R-4-L-R.
Ph.D. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

ASESOR: C. Gutiérrez
Ph.D. CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
DEDICATORIAS.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
DATOS BIOGRÁFICOS	ix
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Transferencia de embriones	3
2.2 División de embriones.....	4
2.3 Somatotropina bovina	8
2.3.1 Usos de la somatotropina bovina	9
2.3.2 Mecanismo de acción de la somatotropina	10
2.4 Evaluación de embriones.....	15
2.5 Reconocimiento materno de la preñez	17
2.6 Literatura citada	19
3 SOMATOTROPINA BOVINA recombinante Y VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINOS DIVIDIDOS	26
3.1 Resumen.....	26
3.2 Abstract	27
3.3 Introducción.....	28
3.4 Material y métodos.....	29

3.4.1	Localización	29
3.4.2	Animales, tratamientos y diseño experimental	29
3.4.3	Manejo nutricional	30
3.4.4	Sincronización de estro, superestimulación y recolección de embriones en vacas donadoras	30
3.4.5	Sincronización de estro en vacas receptoras y transferencia de embriones.....	31
3.4.6	Ultrasonografía.....	31
3.4.7	Determinaciones plasmáticas de insulina e IGF-1	32
3.4.8	Variables evaluadas.....	32
3.4.9	Análisis estadístico.....	32
3.5	Resultados y discusión	34
3.5.1	Respuesta a la superestimulación	34
3.5.2	Respuesta en las receptoras	40
3.6	Conclusión	47
3.7	Literatura citada	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Factores que afectan la tasa de gestación de embriones divididos ...	7
Cuadro 2. Efecto de la somatotropina bovina sobre tejidos y procesos fisiológicos específicos en vacas lactantes	12
Cuadro 3. Medias $\pm$ error estándar de embriones transferibles, embriones degenerados, ovocitos y estructuras totales de vacas donadoras Charolais tratadas o no con rbST.	34
Cuadro 4. Influencia de la aplicación de rbST en las características del estro y el porcentaje de gestación de vacas receptoras.....	41
Cuadro 5. Tasa de gestación de receptoras tratadas o no con rbST, transferidas con un medio embrión procedente de una donadora tratada o no con rbST	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentración plasmática de IGF-1 en vacas donadoras.....	35
Figura 2. Concentración plasmática de insulina en vacas donadoras.....	36
Figura 3. Concentración plasmática de insulina en vacas receptoras.....	45
Figura 4. Concentración plasmática de IGF-1 en vacas receptoras.....	46

DEDICATORIAS

A mis padres **Juan Manuel Márquez Huerta y Rosalba Hernández Mojica** con todo mi amor, cariño, respeto y admiración, esto es por y para ustedes.

A mis hermanos **Eduardo Francisco Márquez Hernández y Rosa Isela Márquez Hernández**, mis sobrinos; **María Fernanda, Manuel Alejandro y Santiago Alain**, de corazón, muchas gracias.

A mi amor y compañera de vida, **Ruby Erika Gutiérrez Aguilar**, por estar a mi lado incondicionalmente, apoyándome en todo momento pero sobre todo por esos angelitos bendiciones de Dios que me han dado la dicha y felicidad más grande en mi vida, mis hijos, **Israel Emiliano Márquez Gutiérrez y Christopher Sebastián Márquez Gutiérrez**, los amo.

Al M.C. **Juan Carlos García Ortiz** por todo el apoyo en este y otros momentos de mi vida, gracias amigo.

Pero antes que a nadie, a **Dios**, por permitirme llegar a este momento, y sobre todo, por tenerlos a todos ellos aquí conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Producción Animal por darme la oportunidad de dar un paso más en mi carrera profesional, a todos mis profesores, especialmente al Ph.D. Raymundo Rangel Santos por su tiempo y dedicación a esta investigación.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Patronato Universitario por todos los recursos brindados para la elaboración de esta investigación.

Al M.C. Juan Carlos García Ortiz por todo el apoyo incondicional brindado para la realización de este trabajo.

Al personal del Modulo de Bovinos Productores de Carne de la Granja Experimental: Clemente, Roberto y Esteban y a todas las personas que participaron en este gran proyecto, por su apoyo en las actividades implicadas en el trabajo de campo de esta investigación.

Al Ph. D. Carlos Gutiérrez Aguilar por su apoyo y colaboración en la realización de esta investigación, a la Ph.D. Clara Murcia por todo el apoyo brindado para los análisis de laboratorio requeridos en este trabajo.

A mis compañeros de generación y de otras generaciones de este posgrado, a mis amigos, Fabián Magaña, Jhon Jatzen, Aldo Torres, Pamela Flores, Paul Cortes, Ursula Hershberger, Ismael Ponce, Leodan Tadeo Rodríguez y Pedro Meda, gracias por su apoyo.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Christofer Israel Márquez Hernández
Fecha de nacimiento	12 de mayo de 1981
Lugar de nacimiento	Estado de México
Profesión	Ingeniero Agrónomo Zootecnista
Cedula profesional	5330660

Desarrollo académico

Bachillerato	Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 35 (1996-1999)
Licenciatura	Universidad Autónoma Chapingo (2000-2005)
Maestría	Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo (2009-2010)

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La división de embriones ha demostrado ser un medio efectivo para incrementar el número de gestaciones por embrión colectado de vacas donadoras cuando se transfieren a receptoras sanas (Shelton y Szell 1988). La transferencia de embriones divididos es un método de reproducción artificial que consiste en la obtención de varios embriones generados por una hembra donante y que serán posteriormente gestados en hembras receptoras, esta técnica, ha sido utilizada exitosamente para multiplicar animales de alto valor genético, con lo cual, permite incrementar el número de crías de hembras con una alto valor genético acortando el intervalo generacional y en consecuencia acelerando el mejoramiento genético de los hatos (Gordon, 2004).

No obstante que la tecnología de la transferencia embrionaria ha avanzado considerablemente en los últimos años, los resultados no han sido muy consistentes, por lo que las investigaciones deben enfocarse en dos aspectos fundamentales, mejorar la respuesta superestimuladora de vacas donadoras de embriones, para obtener un mayor número de embriones transferibles, y aumentar el porcentaje de gestación en las receptoras en los programas de transferencia de embriones divididos. En este respecto algunos investigadores han propuesto una gran variedad de opciones para incrementar la respuesta superestimuladora, una de ellas es la de incrementar la cantidad y calidad de folículos presentes en el ovario al momento de la superestimulación a través de la aplicación de somatotropina, la cual al inducir la síntesis de factores de crecimiento parecidos a insulina (IGF's) puede incrementar la cantidad de folículos pequeños en los ovarios (Gong *et al.*, 1993b), ya que estos tienen un efecto marcado en las primeras etapas de la foliculogénesis y con ello, puede aumentar el número de embriones obtenidos por hembra donante.

En vacas superestimuladas el tratamiento con somatotropina bovina recombinante (rbST) incrementa la proporción de embriones transferibles (Gong *et al.*, 1996), así como el porcentaje de gestación en hembras receptoras (Moreira *et al.*, 2002). La hormona del crecimiento (GH) y los IGF-1 favorecen el desarrollo embrionario temprano (Moreira *et al.*, 2001), sin embargo, el mecanismo de acción de la rbST aún no es claro. Las evidencias indican que el efecto de la GH sobre la maduración del ovocito, la fertilización y el desarrollo embrionario puede ser directo o indirecto a través de los factores de crecimiento parecidos a insulina tipo 1 (IGF-1). Así en los bovinos la bST y el IGF-1 aumentan la proporción de ovocitos fertilizados y el porcentaje de embriones que llegan a la etapa de blastocisto (Morales *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2002). Por otro lado, en los bovinos se observa un incremento en las concentraciones de insulina después de la aplicación de bST (Gong *et al.*, 1993b; Rodríguez *et al.*, 2009) la cual, también favorece el desarrollo embrionario y aumentan la proporción de embriones que alcanzan la etapa de blastocisto. (Augustin *et al.*, 2003) y podría estar influyendo en el mejoramiento de la fertilidad observada en los animales tratados con bST. La presente investigación pretende probar si la aplicación de somatotropina al final del tratamiento de superestimulación mejora la respuesta e incrementa el número de embriones transferibles, además de probar si afecta el porcentaje de gestación cuando se aplica en receptoras en un programa de transferencia de embriones divididos. 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 el ganado para carne, así mismo se aborda una revisión sobre la somatotropina bovina, sus usos y principales mecanismos de acción. También se presenta una breve descripción del procedimiento para la evaluación de embriones y finalmente un tema sobre los mecanismos del reconocimiento materno de la preñez en vacas. En el Capítulo 3 se presentan los resultados generados de un estudio realizado en vacas Charolais, cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la somatotropina bovina recombinante en la respuesta superestimuladora de vacas donadoras, así como en el porcentaje de gestación en vacas receptoras.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Transferencia de embriones

La transferencia de embriones (TE) es un método de reproducción artificial que consiste en la obtención, antes de la implantación, de embriones generados por una hembra donadora que serán transferidos a hembras receptoras que llevan el desarrollo de los mismos hasta el final de la gestación. Las tecnologías reproductivas como la inseminación artificial (IA) y la TE han tenido consecuencias económicas de largo alcance en los hatos comerciales de ganado para carne y leche. La aplicación de esta técnica en los animales domésticos puede servir para multitud de objetivos de orden genético, económico y biológico. Debido a ello, la reproducción desempeña un papel crucial en la determinación del proceso genético realizado en las empresas ganaderas. Las tecnologías que implican a los embriones son una combinación de reproducción asistida, biología molecular, celular y técnicas genómicas, su uso en la cría de ganado bovino ha sido el de incrementar el número de genotipos superiores. La TE está constituida por una serie de etapas que parten de un determinado número de donadoras y termina con productos vivos nacidos después de la transferencia. Con el fin de incrementar la descendencia, una hembra donadora podrá ser inducida a varios ciclos sucesivos de producción de embriones. Estas hembras seleccionadas por su alto valor genético reciben un tratamiento para la sincronización del estro y de superestimulación ovárica que permite generar un número de ovocitos superior a las posibilidades naturales (FAO, 1991). La fecundación de estos ovocitos es obtenida generalmente por inseminación artificial con semen procedente de machos de alto valor genético. Los embriones son extraídos a los siete días de desarrollo gestacional por vía no quirúrgica, después de una evaluación de su morfología y estadio

de desarrollo, podrán ser transferidos a hembras receptoras de un merito genético inferior al de la donadora directamente o después de un proceso de crioconservación, o podrán ser micromanipulados con fines de incrementar la respuesta en las donadoras como en el caso de la división de embriones (Navarro *et al.*, 2003). El ciclo estral de las receptoras se sincroniza previamente mediante un tratamiento hormonal para asegurar a los embriones transferidos un ambiente uterino adaptado biológicamente a su estadio de desarrollo (FAO, 1991).

La transferencia de un embrión puede reducir problemas de infertilidad, *e.g* falla en la fertilización, pérdidas embrionarias tempranas, especialmente durante el estrés calórico. Además se ha reportado que la transferencia de embriones en vacas receptoras previamente inseminadas mejora la tasa de preñez así como la tasa de partos gemelares (Dochi *et al.*, 2008).

2.2 División de embriones

La división de embriones es una técnica que permite la producción de gemelos idénticos y más crías producidas por donadora en los programas de transferencia de embriones. En la década de los 70 se pensaba que los embriones en fases tempranas de la segmentación no sobrevivirían después de una microcirugía. Fue en los años ochenta cuando se demostró que las mórulas y blastocistos de animales domésticos eran capaces de desarrollarse después de una partición y producir crías viables (Rorie *et al.*, 1987). Actualmente los embriones bovinos son micromanipulados para ser divididos en dos partes (demiembriones) y producir gemelos idénticos, además de incrementar la eficiencia de programas tradicionales de TE a nivel comercial (Cutini *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2003).

El éxito de la producción de crías viables después de la división varía dependiendo de algunos factores como son: la técnica de división (Mertes y Bondioli., 1985), la edad y estado de desarrollo del embrión (Williams *et al.*, 1984; McEvoy *et al.*, 1990), método de transferencia (Takeda *et al.*, 1986) y el

tipo y condición de las receptoras (Arave *et al.*, 1987; Bredbacka *et al.*, 1992). Las mórulas compactas y blastocistos de siete días son consideradas las más adecuadas para la división. La división de embriones se realiza con ayuda de una micronavaja. Las tasas de preñez con embriones divididos dependen de la calidad de los hemiembriones con resultados que van desde un 76.2% de gestación para mitades de calidad muy buena, hasta un 24.7% para aquellas de calidad regular, lo cual sugiere la necesidad de destinar a la micromanipulación sólo embriones de excelente y buena calidad (Cutini *et al.*, 2000) y tener menos variabilidad en los resultados a fin de lograr tasas de preñez más aceptables (Bredbacka, 1995).

Resultados de estudios experimentales y comerciales han demostrado que la sobrevivencia de embriones divididos es similar a la de los embriones enteros (Williams *et al.*, 1984; Leibo y Rall, 1987; Lopes *et al.*, 2000) y en algunas ocasiones la división de embriones incrementa el número de crías nacidas (Lambeth *et al.*, 1983; Leibo y Rall, 1987; Gray *et al.*, 1991). Adicionalmente, otros estudios han reportado porcentajes de gestación de 100 % al transferir un solo embrión dividido (Leibo y Rall, 1987; Kippax *et al.*, 1991; Loskutoff *et al.*, 1993) comparativamente con un 84% al transferir 2 embriones divididos en la misma receptora (Kippax *et al.*, 1991). Los porcentajes de gestación más altos han sido obtenidos al transferir un solo embrión dividido (Williams *et al.*, 1984; Bredbacka *et al.*, 1994). La tasa de sobrevivencia del embrión no es afectada por el estadio de desarrollo del embrión obtenido entre los días 6.5 a 7.5 (Gray *et al.*, 1991; Kippax *et al.*, 1991; Loskutoff *et al.*, 1993). En general, los resultados muestran la efectividad de las tecnologías mencionadas y el potencial que representa su implementación en las explotaciones comerciales.

Las evidencias experimentales indican que existe una relación inversa entre el número de divisiones realizadas al embrión y el porcentaje de éxito. Las tasas de producción de gemelos monocigóticos van desde poco más de 30% en bovinos y ovinos (Williams *et al.*, 1984) hasta casi 70% en bovinos, con porcentajes de gestación superiores a 60% (Rorie *et al.*, 1987). El número de

células del embrión no solo limita el número de segmentos en que pueda dividirse, sino que también tiene incidencia en otros aspectos. Típicamente se utilizan embriones en etapa de mórula o blastocisto (Baker, 1985; Seidel, 1993). La división de embriones permite utilizar uno de los segmentos para otros fines experimentales como la determinación del sexo del embrión, mientras que el resto se cultiva o congela para después transferirse a hembras sincronizadas previamente.

Los embriones en etapa de blastocisto son seccionados de manera que se dividan en dos partes iguales, tanto la masa celular interna (MCI) como el trofoectodermo. Es recomendable emplear soluciones que deshidraten ligeramente al embrión (por ejemplo, sacarosa 200 mM), con lo que se reduce el daño al trofoectodermo durante su partición, sin embargo, a nivel comercial su costo es elevado. Una vez cortadas, las mórulas compactas y los blastocistos no necesariamente deben ser introducidos a zonas pelúcidas vacías, teniendo una sobrevivencia aceptable al ser transferidas en hembras receptoras; aunque existen informes que indican tasas de supervivencia de 15% en medios embriones (demiembriones) sin zona pelúcida y de 35% cuando se transfieren con zona pelúcida (Navarro *et al.*, 2003). En este último caso las tasas de gestación van de 55 a 65% en bovinos (Baker, 1985). Willadsen y Godke (1984) obtuvieron tasas de gestación de 80% en embriones diseccionados de ovino indistintamente si tenían zona pelúcida o no. Estos mismos autores produjeron los primeros gemelos idénticos bovinos después de la división de ocho embriones. En el

Cuadro 1 se muestran algunos de los factores principales que afectan las tasas de éxito de embriones divididos. Desde entonces se han reportado producciones de gemelos idénticos a partir de embriones bovinos divididos, y se ha desarrollado una técnica de división simplificada que se puede llevar a cabo en condiciones de campo (Seike *et al.*, 1989).

Cuadro 1. Factores que afectan la tasa de gestación de embriones divididos

Factores	Consideraciones
Calidad morfológica	Mejor la calidad 1 que la 2
Fase de segmentación de los embriones	Mayor tasa de gestación con blastocistos que con mórulas
Número de secciones en las que se divide	Los medios embriones sobreviven mejor en el útero que los cuartos de embrión. Estos últimos carecen de masa celular interna funcional y tienen menor viabilidad
Presencia de zona pelúcida	Resultados controversiales, necesario en algunos casos o con escasa diferencia
Sistema de cultivo de embriones divididos	Mejor en oviductos ligados que <i>in vitro</i>
Número de demi-embriones	Relación directa entre el número de demi-embriones transferidos a receptoras y la tasa de gestación
Preservación	Menor probabilidad de sobrevivencia de embriones divididos
Sexo	Afectado por la manipulación y el cultivo de los embriones, mayor pérdida de embriones femeninos

Adaptado de Navarro *et al.*, 2003

Seike *et al.* (1989) obtuvieron una tasa de gestación de 72.9% con embriones completos con zona pelúcida intacta, de la misma forma, al transferir uno o dos medios embriones sin zona pelúcida en cada una de las receptoras, obtuvieron una tasa de gestación de 61.5% para aquellas receptoras a las cuales se les

transfirieron dos medios embriones y 72.6% para las que recibieron sólo una mitad, no encontrando diferencias estadísticas entre transferir un embrión completo con zona pelúcida intacta y transferir un medio embrión. Además la tasa de gestación no presentó diferencias significativas por el hecho de transferir medios embriones provenientes de mórulas (76.3%), blastocistos tempranos (75%) y blastocistos (62.5%).

2.3 Somatotropina bovina

La hormona del crecimiento o somatotropina (GH) es una hormona proteíca producida en las células acidófilas de la pituitaria anterior, está regulada por las hormonas hipotalámicas, factor liberador de somatotropina y la somatostatina (Etherton y Bauman 1998). La GH está compuesta por 191 aminoácidos que varían de acuerdo a la especie; por ejemplo, la somatotropina bovina humana difieren en un 35% en cuanto a sus aminoácidos, sin embargo, la ST bovina y la ovina son casi idénticas (Bauman, 1992a), con un peso molecular de 22 kDa, su estructura es cuaternaria formada por cuatro hélices y con dos dominios, el somatogénico y el lactogénico (Van der Walt, 1994).

Hacia el inicio de la década de los años 80 se sintetizó somatotropina bovina por medio de tecnología con DNA recombinante (rbST), clonando un segmento específico de DNA bovino en la bacteria *Escherichia coli* K-12, donde la molécula resultante mostró ser biológicamente idéntica a la natural (Bauman, 1992; Chalupa *et al.*, 1996).

Los efectos principales de la GH se han observado en tejidos esquelético, muscular y adiposo (Hill, 1989), en el aumento en la disponibilidad de glucosa circulante y el estímulo en el páncreas para la liberación de insulina (Prado *et al.*, 2003). En forma general la GH actúa en la síntesis de proteínas, incrementando la relación nitrógeno: fósforo en el organismo, aumentando el transporte de los aminoácidos hacia el interior de la célula y estimulando la síntesis de ácidos nucleicos. También estimula la hidrólisis de los triglicéridos del tejido adiposo, lo que se traduce en la movilización de reservas de grasa

(McCutcheon and Bauman, 1986). Otros autores han encontrado que puede modificar las concentraciones circulantes de proteínas de alta y baja densidad, ello depende de la especie y la dieta suministrada en ese momento. En rumiantes dichas proteínas son la principal fuente plasmática de colesterol, el cual al incrementar sus concentraciones favorece una mayor producción de progesterona (Spicer y Echterkamp, 1995).

La mayoría de los receptores para somatotropina bovina (bST) se encuentran en el hígado, donde estimula la gluconeogénesis aumentando el aporte de glucosa a la circulación, aunque también se les encuentra en útero y ovarios, donde la unión de la bST con sus receptores induce la síntesis y secreción del factor de crecimiento parecido a la insulina (Lucy, 2000). Aproximadamente 24 horas después de la aplicación de bST se incrementan las concentraciones periféricas de ST, y 24 horas después del incremento de la ST se incrementa la concentración de IGF-1 (Gong *et al.*, 1993a; Gong *et al.*, 1999), persistiendo hasta por tres semanas (Cushman *et al.*, 2001).

2.3.1 Usos de la somatotropina bovina

La utilización de la bST ha demostrado tener un efecto similar al que presenta la hormona natural en la producción de leche (Bauman, 1999). En la glándula mamaria se produce un aumento de la síntesis láctea debido a una mayor captación de los nutrientes utilizados para su secreción y a un aumento en la actividad secretora de las células y la perfusión sanguínea (Bauman, 1999; Bauman y Vernon 1993). No obstante, la magnitud del incremento en la producción como respuesta a la aplicación de bST está influenciada por factores internos y externos, como la temperatura ambiente, el manejo general del rebaño, el período de lactancia, el potencial genético y la cantidad de leche producida (Bauman, 1999).

Los primeros estudios con bST fueron realizados por científicos rusos en 1937, cuando trataron a 600 vacas con bST extraída de glándulas pituitarias de vacas sacrificadas (Bauman, 1999). En el ganado lechero es común el uso de la bST

para incrementar la producción de leche. La utilización de esta hormona en forma periódica, aumenta la producción láctea de 10 a 20%. Algunos de los efectos de la bST en la producción de leche obedecen a la acción directa de esta hormona; sin embargo, el mayor efecto es provocado por el IGF-I, el cual se incrementa en respuesta al tratamiento con bST (Bauman, 1999).

2.3.2 Mecanismo de acción de la somatotropina

Parece ser que los efectos indirectos de la bST se asocian primordialmente con la glándula mamaria a través de las acciones de la familia de los IGF's. Esta familia es compleja, e incluye el IGF-I y el IGF-II, dos tipos específicos de receptores de IGF y seis proteínas específicas de unión al IGF (IGFBP). La acción de las IGFBP incluyen el fungir como vehículos de transportación circulatorios, facilitando el desplazamiento de los IGF por todo el organismo y/o modulando directamente las acciones de los IGF en células específicas, ya sea intensificando su actividad o bloqueándola. La aplicación de bST a las vacas en lactancia provoca un aumento en las concentraciones circulantes de IGF-I y altera algunas de las IGFBP. Los efectos indirectos del sistema IGF implican un aumento de síntesis de leche por células de la glándula mamaria y una mejoría en el mantenimiento de las células mamarias. Son estas alteraciones las que producen los notables cambios en la forma de la curva de lactancia que incluyen tanto el incremento en la síntesis de leche como una mejoría en la persistencia (Bauman, 1992; Bauman, 1993). El Cuadro 2 resume las principales etapas coordinadas que se presentan al tratar una vaca lechera con bST.

Así pues, el tratamiento con bST incrementa la síntesis de leche en la glándula mamaria, a la vez que promueve otros procesos corporales para proporcionar los nutrientes necesarios para sustentar este aumento en el índice de síntesis de leche (Bauman *et al.*, 1989; Burton *et al.*, 1994). Las acciones fisiológicas principales de la GH son estimular directa o indirectamente los procesos biológicos tales como división celular, crecimiento esquelético y síntesis proteica, actividades promotoras de crecimiento y galactopoieticas. Además se

observan importantes efectos metabólicos incluyendo incremento en oxidación de grasas e inhibición del transporte de glucosa a los tejidos corporales. También actúa directamente uniéndose a los receptores en las células precursoras de huesos, músculos y células grasas, lo que resulta en su diferenciación y proliferación. Actúa indirectamente al estimular el hígado y páncreas (Gong *et al.*, 1991; MacGuire *et al.*, 1992) para sintetizar y secretar los IGF's, los cuales actúan en los tejidos periféricos promoviendo el crecimiento (Hill, 1989).

La mayoría de los efectos metabólicos de la bST se llevan a cabo de manera directa, pero otros se realizan de manera indirecta a través de la somatomedinas, producidas en el hígado por estimulación de la bST (Lucy, 2000). Las somatomedinas actúan principalmente como hormonas parácrinas o autócrinas en diferentes tejidos (Davis *et al.*, 1994). Gong *et al.* (1999) encontraron que la aplicación de bST en vacas no lactantes y lactantes en balance energético positivo resulta en mayores concentraciones de glucosa, insulina, colesterol e IGF-I en plasma, así como el aumento en la producción láctea (Gulay *et al.*, 2004).

La bST y el IGF-I también desempeñan funciones importantes en el control de la reproducción. Las dos hormonas participan en la regulación del desarrollo folicular, en la función del cuerpo lúteo y especialmente en el desarrollo embrionario temprano. Lucy *et al.* (2000) encontraron que existe un efecto directo de la GH en los ovarios, pues existe la presencia de receptores para esta hormona en el ovario bovino, sin embargo, estos receptores parecen estar confinados al tejido luteinizado, y raramente se encuentran presentes en los folículos. El efecto de la GH en las células de la granulosa depende del grado de diferenciación que estas poseen. La bST incrementa la producción de progesterona por las células de la granulosa luteinizadas (Gong *et al.*, 1994), mientras que en aquellas que no han sufrido luteinización no tiene efecto (Gutiérrez *et al.*, 1997).

La aplicación de bST en vacas lactantes alteró la dinámica folicular provocando un aumento en la cantidad de folículos de 6-9 mm durante la primera onda folicular (De la Sota *et al.*, 1993). La foliculogénesis depende en gran medida de

Cuadro 2. Efecto de la somatotropina bovina sobre tejidos y procesos fisiológicos específicos en vacas lactantes

Tejido	Proceso afectado durante los primeros días y semanas de tratamiento
Mamario	↑ Síntesis de leche con composición normal ↑ Utilización de todos los nutrientes y síntesis de leche por célula secretora ↑ Número y mantenimiento de células secretoras ↑ Flujo sanguíneo y suministro de nutrientes consistente con el aumento en la producción de leche
Hepático	↑ Índices de producción de glucosa ↓ Capacidad de la insulina para inhibir la producción de glucosa
Adiposo	↓ Depósito de grasa si existe balance positivo de energía ↑ Movilización de grasa si existe balance negativo de energía ↓ Capacidad de la insulina para estimular el depósito de grasa ↑ Capacidad de las catecolaminas para estimular el uso de reservas corporales de grasa
Intestinal	↑ Absorción de Ca, P y otros minerales requeridos para la síntesis de leche
Cuerpo entero	↓ Oxidación de glucosa para reservar el uso para la síntesis de leche ↑ Oxidación de ácidos grasos si existe balance negativo de energía - Φ Gasto de energía para mantenimiento ↑ Gasto de energía consistente con el incremento en la producción de leche (es decir, no cambia la energía por unidad de leche) ↑ Gasto cardíaco consistente con el aumento en la producción de leche ↑ Respuesta inmune ↑ Eficiencia productiva (leche por unidad de ingesta de nutrientes)

Adaptado de Bauman, (1992) y Bauman y Vernon (1993). Cambios ($\uparrow$ = aumento, $\downarrow$ = disminución, Φ = ausencia de cambio) que se presentan en el periodo inicial de la suplementación con bST, cuando los ajustes metabólicos coinciden con el incremento en el uso de nutrientes para la síntesis de leche (Bauman, 1999).

los IGF's interviniendo en el crecimiento de los folículos preantrales, siendo esta la principal relación existente entre la respuesta a la ovulación y la aplicación de GH (Monniaux *et al.*, 1997). Se ha observado un incremento en el número de folículos antrales (2-5 mm) reclutados durante las ondas foliculares en las vacas, no alterándose la secreción de gonadotropinas o los efectos del folículo dominante (Gong *et al.*, 1991).

La aplicación de bST en animales infértiles el día del estro puede mejorar el desarrollo del embrión, y en consecuencia la fertilidad. El fundamento se basa en que después de la aplicación de bST incrementa en plasma las concentraciones de Progesterona (P_4), estimulando la función del cuerpo lúteo y del IGF-I, lo cual podría reflejarse también en la actividad secretora del oviducto y útero, y en el desarrollo del embrión (Lucy *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha demostrado que la bST incrementa en plasma las concentraciones de progesterona lo que también favorecería la diferenciación y el crecimiento embrionario (Lucy *et al.*, 1995).

La liberación de IGF-1 por el hígado, en respuesta al tratamiento con bST desempeña un papel importante en el reconocimiento materno de la gestación. Esto ocurre debido a cierta dependencia parcial de los embriones al IGF-1, en el sentido de secretar factores esenciales en el proceso de señalización por la presencia de estos en el útero (Lucy *et al.*, 1995).

Morales *et al.* (2001) realizaron un experimento en el cual se evaluó el efecto del tratamiento corto en vacas repetidoras con dos inyecciones subcutáneas de 500 mg de bST al inicio del estro, mejorando significativamente la fertilidad ($p < 0.05$) ya que la concepción fue mejor en las vacas tratadas (35.8%) que en las vacas testigo (25.2%). Por otro lado, Hernández *et al.* (2000) trabajando con vacas de primer servicio y vacas repetidoras a las cuales aplicaron una sola

dosis de 500 mg de bST al momento de la inseminación, no encontraron diferencias significativas en las vacas de primer servicio ($p>0.05$). Sin embargo, en las vacas repetidoras observaron un efecto significativo ($p<0.05$) en la fertilidad, las vacas del grupo tratado tuvieron mayor porcentaje de concepción que el grupo testigo (46 vs 35 %).

Estudios *in vitro* e *in vivo*, muestran efectos favorables del IGF-I en el desarrollo embrionario (Block, 2007). El IGF-I evita el efecto negativo de algunas sustancias tóxicas presentes en el medio uterino para los embriones. Los primeros resultados de estos estudios demostraron que un tratamiento con 500 mg de bST el día de la inseminación y una segunda dosis 10 días después, incrementaron el porcentaje de concepción en vacas repetidoras. En un estudio posterior, en el cual se aplicó una sola inyección de bST al momento de la inseminación, Mendoza (2000) observó un aumento de la fertilidad. En otro estudio la misma inyección de bST el día de la inseminación, redujo la proporción de embriones con anormalidades de desarrollo (Navarro *et al.*, 2003). Estos experimentos permiten proponer que la aplicación de bST el día del servicio aumenta el porcentaje de concepción mediante el mejoramiento del desarrollo embrionario temprano (Hernández y Morales, 2001).

Por otro lado, la cantidad de bST recomendada para aumentar la producción láctea en vacas lecheras es de 500 mg (Prosilac®), sin embargo, Cushman *et al.* (2001), Moreira *et al.* (2002), Hasler *et al.* (2003) y Gong *et al.* (1993a) no encontraron diferencias significativas al aplicar 320 y 500 mg de bST en vaquillas y vacas de carne cuando evaluaron sus efectos reproductivos.

Adicionalmente, se han realizado algunos trabajos para determinar el efecto que tiene la ST cuando se incluye en el protocolo de superestimulación. Herrler *et al.* (1990) encontraron que un pre tratamiento con GH seguido de PMSG en vacas Holstein aumentó el número de embriones producidos (3.8 ± 1.1 vs 1.9 ± 0.7). Gong *et al.* (1993b) realizaron varios experimentos con vaquillas aplicando ST cinco días antes del tratamiento superestimulador con PMSG y encontraron

un incremento en el número de folículos mayores a 5 mm, en la tasa de ovulación y en el número de embriones transferibles de las vacas pre tratadas.

Otros trabajos utilizando FSH en el tratamiento superestimulador se reportaron incrementos en la tasa de ovulación y número total de embriones transferibles (Gong *et al.*, 1993b). Sin embargo, Rieger *et al.* (1991) trabajando con vaquillas Holstein no encontraron incremento en el número de embriones transferibles por el pre tratamiento con ST incluyendo FSH en el protocolo de superestimulación.

En vacas Nellore, Buratini *et al.* (1998) aplicaron ST conjuntamente con la aspiración del folículo dominante encontrando un incremento en el número de folículos pequeños ($p<.05$) lo cual fue atribuido a que la aplicación de la ST indujo un incremento en las concentraciones circulantes de IGF-1. Estos resultados son similares a los encontrados por Carter *et al.* (1998), quienes suministraron 500 mg de ST a vacas Nellore durante la época seca, y encontraron diferencias significativas ($p<.05$) en el número de folículos pequeños (2-5 mm) entre el grupo tratado con ST y el grupo testigo.

Se han encontrado efectos secundarios favorables asociados a la aplicación prolongada de rbST. Cole *et al.* (1991) reportaron un incremento del 5.4% de partos gemelares en vacas tratadas con ST comparándolas con el grupo testigo.

2.4 Evaluación de embriones

El criterio más ampliamente utilizado para la evaluación de embriones bovinos es evaluar si un embrión ha alcanzado un adecuado estadio de desarrollo. Aparentemente se obtiene menor éxito cuando los embriones presentan un grado de desarrollo atrasado de aproximadamente 48 horas (Seidel, 1993). Los embriones recuperados de vacas superestimuladas suelen mostrar una amplia gama en su estadio de desarrollo. Gary y Raymond Jr. (1983) encontraron una mayor proporción de mórulas y mórulas compactas entre los días cinco y seis después del estro. Blastocistos tempranos y blastocistos se encontraron más

frecuentemente en el día 7, y blastocistos expandidos y eclosionados en los días 8 y 9.

Se ha estimado que el diámetro total del embrión bovino es de aproximadamente 150-190 micras incluyendo el espesor de la zona pelúcida de 12-15 micras (Lindner y Wright 1983) Este diámetro se mantiene prácticamente inalterado desde el cigoto hasta el blastocisto expandido. El examen microscópico del embrión es sólo una estimación del número de células presentes dentro del mismo, no distinguiendo más de 16 células.

Gary y Raymond Jr. (1983) y Palma (2001) describen el desarrollo de los embriones comúnmente recuperados después de una extracción no quirúrgica de la siguiente forma:

Mórula (Día 5-6): Comúnmente referido como una "bola de células" son blastómeros individuales difíciles de distinguir uno del otro. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del saco perivitelino.

Blastocisto temprano (Día 7-8): Es un embrión que ha formado una cavidad o blastocele llena de líquido. El embrión ocupa del 70 al 80% del espacio perivitelino. Puede ser posible una diferenciación visual entre el trofoblasto y la masa celular interna.

Blastocisto: La masa celular interna es más compacta y más oscura, las células del trofoblasto están más separadas, el blastocele es evidente ocupando gran parte del saco perivitelino.

Blastocisto expandido: En este caso el blastocele 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.

Blastocisto eclosionado: Cuando el blastocele 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.

2.5 Reconocimiento materno de la preñez

Las interacciones entre el útero materno y el embrión en crecimiento que interfieren en su desarrollo normal y la progresión de la gestación son complejas (Simmen, *et al.*, 1993). Después de la concepción, el embrión atraviesa el oviducto, se implanta en el útero y desarrolla un feto viable, el cual resultará en una cría sana al final de la gestación (Velazquez *et al.*, 2008). El reconocimiento materno de la gestación es un proceso de interacción entre la hembra y las células trofoblásticas del embrión, las cuales secretan sustancias responsables de mantener la gestación. De esta manera el embrión debe establecer los mecanismos que evitan la regresión del cuerpo lúteo durante los días 15 a 17 posteriores a la inseminación, período crítico para el establecimiento de la preñez del ciclo reproductivo de hembras bovinas (Binelli, *et al.*, 2001). Este proceso de regulación parácrina en el endometrio se consigue mediante la secreción de interferón tau (IFN τ) (Thatcher *et al.*, 1995), siendo este el elemento clave en el proceso antiluteolítico debido a su capacidad de suprimir la síntesis de PGF $_{2\alpha}$ vía inhibición de la proteína kinasa C (PKC), fosfolipasa A $_2$, COX 2 o receptores para oxitocina y estradiol (Thatcher *et al.*, 2001).

El IFN τ es la secreción más importante en el reconocimiento y mantenimiento de la gestación en las vacas (Imakawa *et al.*, 1987; Kerbler *et al.*, 1997; Thatcher *et al.*, 1997), esta sustancia es producida por las células trofoblásticas embrionarias en grandes cantidades (Helmer *et al.*, 1987; Roberts *et al.*, 1992). En bovinos el IFN τ comienza a ser secretado alrededor del día 8 al 10 de la gestación y alcanza su pico máximo entre el día 14 y 17 (Wathes y Lamming, 1995).

El embrión debe alcanzar un tamaño adecuado por el día 16 de gestación con el fin de producir suficiente IFN τ para prevenir la luteólisis y lograr con éxito el

reconocimiento materno de la gestación (Mann y Lamming, 2001; Robinson *et al.*, 2006). La producción de IFN γ por parte del embrión depende en gran medida de una adecuada secreción de progesterona materna, especialmente durante la primera semana después de la ovulación.

Estudios recientes implican algunas proteínas conocidas como factores de crecimiento en la iniciación, establecimiento y mantenimiento de la preñez, además de la comunicación entre el embrión y la hembra. La familia de los IGF-1 parece funcionar como un mediador en el desarrollo del útero y del embrión durante la etapa temprana de la preñez, en virtud de su habilidad para influenciar directa o indirectamente la síntesis y secreción de proteínas del útero y del embrión (Lucy *et al.*, 1995). Los modos de acción autócrinos y parácrinos de los IGF-1 son modulados en el microambiente uterino por los receptores IGF tipo 1 y las proteínas de unión IGFBPs, las cuales están sometidas al control local en el útero y el embrión (Simmen *et al.*, 1993).

Los modelos de producción de embriones *in vitro* han demostrado claramente que el IGF-1 puede ejercer un efecto positivo en el desarrollo embrionario bovino y su pre-implantación. El IGF-1 endócrino podría influenciar directamente en la supervivencia del embrión después de su traslado al lumen del tracto reproductivo o indirectamente a través de los ovarios, oviducto o útero (Velázquez *et al.*, 2008); de hecho embriones producidos *in vitro* cultivados en un medio adicionado con IGF-1 obtuvieron mayores tasas de preñez al ser transferidos a receptoras. Dichos efectos debieron ser mediados a través de una acción directa del IGF-1 (Block, 2007). La alta expresión de receptores para IGF-1 en el oviducto y en las glándulas endometriales sugiere que el IGF-1 tiene un importante efecto indirecto alterando las secreciones del endometrio en donde la supervivencia del embrión en estadio de desarrollo temprano es enteramente dependiente (Wathes *et al.*, 1997).

El IGF-1 estimula la producción de progesterona (Sauerwein *et al.*, 1992), sin embargo, las concentraciones circulantes de IGF-1 no parecen estar directamente relacionados con la función de cuerpo lúteo (Yung *et al.*, 1996).

2.6 Literatura citada

- Augustin, R., P. Pocar, C. Wrenzycki, H. Niemann, and B. Fischer. 2003. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction* 126: 91-99.
- Arave, C. W., T. D. Bunch, C. H. Mickelsen, and K. Warnick. 1987. Factors affecting survivability of transferred whole and demi-embryos in a commercial dairy herd. *Theriogenology* 28: 373-382.
- Baker, R. D. 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology* 23: 3-12.
- Bauman, D. E., F. R. Dunshea, Y. R. Boisclair, M. A. McGuire, D. M. Harris, and K. L. Houseknecht. 1989. Regulation of nutrient partitioning: homeostasis, homeorhesis, and exogenous somatotropin. Keynote Address In: F. A. Kallfelz. *Proceedings of the VIIth International Conference on Production Disease in Farm Animals*. Cornell University, Ithaca, NY. pp: 306-323.
- Bauman, D. E. 1992. Bovine somatotropin: Review of an emerging animal technology. Cornell University, Ithaca, NY. *Journal Dairy Science* 75: 3432-3451.
- Bauman, D. E., and R. G. Vernon. 1993. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Annual Reviews Nutrition* 13: 437-461.
- Bauman, D. E. 1999. Bovine somatotropin and lactation: From basic science to commercial application. Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, NY. *Domestic Animal Endocrinology* 17: 101-116.
- Binelli, M., W. W. Thatcher, and R. Mattos. 2001. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 56: 1451-1464.
- Block, J. 2007. Use of insulin-like growth factor-1 to improve post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology* 68: 49-55.
- Bredbacka, P., M. Huhtinen, J. Aalto, and V. Rainio. 1992. Viability of bovine demi and quarter embryos after transfer. *Theriogenology* 38: 107-113.
- Bredbacka, P. R., Velmala, J. Peippo, and K. Bredbacka. 1994. Survival of biopsied and sexed bovine demiembryos. *Theriogenology* 41: 1023-1031.
- Bredbacka, P. 1995. Factors affecting cell viability during bisection of bovine embryos. *Theriogenology* 44: 159-166.
- Buratini, Jr. J., C. A. Price, G. A. Bo, M. R. B. Mello, M. E. O. A. Assumpção, L. M. T. Tavares, and J. A. Visinti. 1998. Effect of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin on follicular dynamics in Nellore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology* 51: 402.

- Burton, J. L., B. W. McBride, E. D. Block, R. Glimm, and J. J. Kennelly. 1994. A review of bovine growth hormone. *Canadian Journal of Animal Science* 74: 167-201.
- Carter, J. A., H. N. Paranagua Jr., H. F. N. Paranagua, and R. A. Godke. 1998. The effect of rbST on follicular population of Nellore heifers during the dry season in Brazil. *Theriogenology* 49: 342.
- Cole, W. J., K. S. Madse, R. S. Hintz, and R. J. Collier. 1991. Effect of recombinantly-derived bovine somatotropin on reproductive performance of dairy cattle. *Theriogenology* 36: 573-595.
- CONARGEN (Consejo Nacional de los Recursos Genéticos Pecuarios A. C.) 2000. Plan de acción: Plan de acción de Bovinos para carne. México. pp: 12-21.
- Cushman, R. A., J. C. De Souza, V. S. Hedgpeth, and J. H. Britt. 2001. Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. *Theriogenology* 55: 1533-1547.
- Cutini A., M. Teruel y J. Cabodevilla. 2000. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones divididos. *Taurus*: 2(7):28-39. http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embionario/02-factores.htm. Consultada el 8 de Noviembre de 2010.
- Chalupa, W. B., D. T. Vecchiarelli, J. D. Galligan, L. S. Ferguson, R. W. Baird, R. J. Hemken, C. G. Harmon, E. D. Soderholm, R. J. Otterby, J. G. Annexstad, W. P. Linn, R. J. Hansen, D. L. Ehle, and R. G. Palmquist. 1996. Responses of dairy cows supplemented with somatotropin during weeks 5 through 43 of lactation. *Journal of Dairy Science* 79: 800-812.
- Davis, J. S., J. V. May, and B. A. Keel. 1994. Mechanism of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 45: 1351-1380.
- De la Sota, R. L., M. C. Lucy, C. R. Staples, and W. W. Thatcher. 1993 Effect of recombinant bovine somatotropin (Sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76: 1002-1013.
- Dochi, O., K. Takahashi, T. Hirai, H. Hayakawa, M. Tanisawa, Y. Yamamoto, and H. Koyama. 2008. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology* 69: 124-128.
- Espinosa G., R. 2000. Situación actual de la inseminación artificial y la transferencia de embriones en México y sus potencialidades. *In*: Memoria del Ciclo de conferencias sobre evaluación, comercialización y mejoramiento genético. 31 de marzo al 4 de abril. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. pp: 30-36.

- Etherton, T. D., and D. E. Bauman. 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological Reviews* 78: 745-761.
- FAO (Food and agriculture organization). 1993. Training manual for embryo transfer in cattle. Animal Reproduction Laboratory. Colorado State University, Fort Collins CO 80523, USA. pp: 41-65.
- Gary, M., L., and W. W. Raymond Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20: 407-416.
- Gong, J. G., T. A. Bramley, I. Wilmut, and R. Webb. 1991. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: Follicular populations and peripheral hormones. *Biology of Reproduction* 45: 941-949.
- Gong, J. G., T. A. Bramley, and R. Webb. 1993a. The effect of recombinant bovine Somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers *Journal of Reproduction and Fertility* 97: 247-254.
- Gong, J. G., T. A. Bramley, I. Wilmut, and R. Webb. 1993b. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biology of Reproduction* 48: 1141-1149.
- Gong, J. G., D. Macbride, T. A. Bramley, and R. Webb. 1994. Effects of recombinant bovine somatotropin, insulin-like growth factors-1 and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. *Journal of Endocrinology* 143: 157-164.
- Gong, J. G., I. Wilmut, T. A. Bramley, and R. Webb. 1996. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* 45: 611-622.
- Gordon I. 2004. *Tecnología de la Reproducción de los Animales de Granja*. Ed. Acibia, S.A. pp: 23-45.
- Gray, K. R., K. R. Bondioli, and C. L. Betts. 1991. The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology* 35: 37-44.
- Gulay, M. S., M. J. Hayen, M. Liboni, T. I. Belloso, C. J. Wilcox, and H. H. Head. 2004. Low doses of bovine somatotropin during the transition period and early lactation improves milk yield efficiency of production and other physiological responses of Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 87: 948-960.
- Gutierrez, C. G. B. K. Campbell, and R. Webb. 1997. Development of a long term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to FSH and morphological characteristics. *Biology of Reproduction* 56: 608-616.
- Helmer, S. D., P. J. Hansen, R. V. Anthony, W. W. Thatcher, F. W. Bazer, and R. M. Roberts. 1987. Identification of bovine trophoblast protein-1 a

- secretory protein immunologically related to ovine trophoblast protein-1. *Journal of Reproduction and Fertility* 79: 83-91.
- Hernández C. J., y J. S. Morales R. 2001. Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *Veterinaria México* 32: 279-287.
- Hernández C. J., G. M. Mendoza, S. Morales, and C. G. Gutiérrez. 2000. A single dose of recombinant bovine somatotropin improves fertility in dairy cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 25: 54 (Abstr).
- Hasler, J. F., C. R. Bilby, R. J. Collier, S. C. Denham, and M. C. Lucy. 2003. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology* 59: 1919-1928.
- Herrler, A., E. Farries, and H. Niemann. 1990. A trial to stimulate insulin like growth factor 1. Levels to improve superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology* 33: 248.
- Hill, D. J. 1989. Growth factors and their cellular actions. *Journal of Reproduction and Fertility* 85: 723-734.
- Imakawa, K., R. V. Anthony, M. Kasemi, K. R. Marotti, H. G. Polites, and R. M. Roberts. 1987. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoblast. *Nature* 330: 377-379.
- Kerbler, T. L., M. M. Buhr, L. T. Jordan, K. E. Leslie, and J. S. Walton. 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47: 703-714.
- 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.
- Leibo, S. P., and W. F. Rall. 1987. Increase in production of pregnancies by bisection of bovine embryos. *Theriogenology* 27: 245 (Abstr).
- Lindner, G. M., and R. W. Wright. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20: 407-416.
- Lopes, R. F. F., C. Termignoni, and J. L. Rodrigues. 2000. Sex determination of bovine embryos using pit-stop PDR. *Theriogenology* 53: 482 (Abstr).
- Loskutoff, N. M., W. H. Johnson, and K. J. Betteridge. 1993. The developmental competence of bovine embryos with reduced cell numbers. *Theriogenology* 39: 95-107.
- Lambeth, V. A., C. R. Lonney, S. A. Voelkel, D. A. Jackson, K. G. Hill, and R. A. Godke. 1983. Microsurgery on bovine embryos at the morulae stage to produce monozygotic twin calves. *Theriogenology* 20: 85-95.

- Lucy, M. C. 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science* 83: 1635-1647.
- Lucy, M. C., W. W. Thatcher, R. J. Collier, F. A. Simmen, Y. Ko, J. D. Savio, and L. Badinga. 1995. Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 12: 73-82.
- Mann, G. E., and G. E. Lamming. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121: 175-180.
- Marques F., P., A. 2006. Influencia da somatotropina recombinante bovina (rbST) aplicada em receptores de embriões bovinos, no dia do estro, sobre variáveis reprodutivas. Tesis de maestría. Universidad Federal de Vicosa. 56 p.
- McCutcheon, S. N., and D. E. Bauman. 1986. Effect of pattern of administration of bovine growth hormone in lactational performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 69: 38-43.
- McEvoy, T. G., and J. M. Sreenan. 1990. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of zona pellucida-free cattle demy embryos. *Theriogenology* 33: 1245-1253.
- McGuire, M. A., J. L. Vicini, D. E. Bauman, and J. J. Veenhuizen. 1992. Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. *Journal of Animal Science* 70: 2901-2910.
- Mertes, P. C., and K. R. Bondioli. 1985. Effect of splitting technique on pregnancy rate from half embryos. *Theriogenology* 23: 209-212.
- Monniaux, D., P. Monget, N. Besnard, C. Huet, and C. Pisselet. 1997. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology* 47: 3-12.
- Morales, R. J., S. L. Zarco, C. J. Hernández, and G. Rodríguez. 2001. Effect of short term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology* 55: 1831-1841.
- Moreira, F., L. Bandinga, C. Burnley, and W. W. Thatcher. 2002. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 57: 1371-1387.
- Navarro M., M. del C., A. Rosado G., S. y Fernando H. 2003. Técnicas de Clonación de Embriones. *Ciencia Veterinaria* 9: 2003-2004.
- Palma A., G., 2001. Evaluación morfológica de los embriones bovinos. *Biotecnología de la Reproducción*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Balcarce, Argentina. 132 p.

- Prado, I. W., G. Nascimento, J. A. Negrao, L. P. Rigolon, S. De Souza, M. Doi, L. Sakuno, and G. L. Pessini. 2003. Recombinant bovine somatotropin (rBST) on hematologic aspects and metabolites of heifers (1/2 Nellore x 1/2 Red Angus) blood, in feedlot. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32: 465-472.
- Rieger, D., J. S. Walton, M. L. Goodwin, and W. H. Johnson. 1991. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotropin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 35: 863-868.
- Robinson, R. S., M. D. Fray, D. C. Wathes, G. E. Lamming, and G. E. Mann. 2006. In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. *Molecular Reproduction and Development* 73: 470-476.
- Roberts, R. M., J. C. Cross, and D. W. Leaman. 1992. Interferons as hormones of pregnancy. *Endocrinology* 13: 432-452.
- Rodríguez-Castañeda O. A., B. Díaz R., O. González O., C. G., Gutiérrez, H. Montaldo H., G. Ortiz C., H. Cerón J. 2009. Porcentaje de gestación al primer servicio en vacas Holstein tratadas con hormona bovina del crecimiento en la inseminación. *Veterinaria México* 40: 1-7.
- Rorie, R. W., and R. A. Godke. 1987. Bisection of bovine embryos. *Embryo technologies to domestic animals*. Codenhagen: 1-9.
- Sauerwein, H. A., J. Miyamoto, H. Günther, H. Meyer, and D. Schams. 1992. Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the estrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility* 96: 103-115.
- Seidel, G. E. 1993. Production of genetically identical sets of mammals: cloning?. *Journal of Experimental Medicine* 228: 347-354.
- 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* 32: 211-220.
- Shelton, J. N., and A. Szell. 1988. Survival of Sheep demi-embryos in vivo and in vitro. *Theriogenology*. 30: 855-863.
- Simmen, R. C. M., Y. Ko, and F. A. Simmen. 1993. Insulin-like growth factors and blastocyst development. *Theriogenology* 39: 163-175.
- Takeda, T., S. V. Hallowell, A. D. McGauley, and J. F. Hasler. 1986. Pregnancy rates with intact and split embryos transferred surgically and nonsurgically. *Theriogenology* 25: 204-207.
- Thatcher, W. W., M. Binelli, J. C. Burke, R. Staples, J. D. Ambrose, and S. Coelho. 1997. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology* 47: 131-140.

- Thatcher, W. W., M. D. Meyer, and G. Danet-Desnoyers. 1995. Maternal recognition of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 49: 329-339.
- Thatcher, W. W., A. Guzeloglu, R. Mattos, M. Binelli, T. R. Hansen, and J. K. Pru. 2001. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 56: 1435-1450.
- Van der Walt, J. G. 1994. Somatotropin Physiology: A review. *South African Society for Animal Science* 24: 5-14.
- Velazquez, M. A., L. J. Spicer, and D. C. Wathes. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domestic Animal Endocrinology* 35: 325-342.
- Wathes, D. C., and G. E. Lamming. 1995. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 49: 53-57
- Wathes, D. C., T. S. Reynolds, R. S. Robinson, and K. R. Stevenson. 1997. Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *Journal of Dairy Science* 81: 1778-1789.
- Williams, T., J., R. Elsdon P., and G. Seidel E. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology* 22: 521-531.
- Willadsen, S. M., and R. A Godke. 1984. A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Veterinary Record* 114: 240-243.
- Yung, M., C., M. Vandehaar J., R. Fogwell L., B. Sharma K. 1996. Effect of energy balance and somatotropin on insulin-like growth factor I in serum and on weight and progesterone of corpus luteum in heifers. *Journal of Animal Science* 74: 2239-2244.

3 SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE Y VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINOS DIVIDIDOS

3.1 Resumen

La aplicación de la somatotropina bovina recombinante (rbST) al momento de la transferencia de embriones bovinos favorece el desarrollo embrionario en vacas donadoras y mejora la tasa de gestación en vacas receptoras. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar el efecto de la aplicación de rbST en la respuesta superestimuladora de vacas donadoras Charolais, así como en el porcentaje de gestación de vacas receptoras en un programa de transferencia de embriones divididos. Las vacas donadoras se dividieron en dos grupos: el grupo donadora-rbST (n=10) recibió 500 mg de rbST sc 48 h antes de la inseminación artificial (IA); el grupo donadora-control (n=11) recibió 5 mL de suero salino fisiológico (SSF) im. Las vacas fueron lavadas mediante una técnica no quirúrgica 8 días después de la IA. Los medios embriones provenientes del grupo donadora-rbST o del grupo donadora-control fueron transferidos aleatoriamente en receptoras que recibieron 500 mg de rbST (receptora-rbST, n=50) ó 5 mL de SSF (receptora-control, n=53) al momento del celo. En vacas donadoras y receptoras se determinaron las concentraciones plasmáticas de insulina y de los factores de crecimiento parecidos a insulina tipo 1 (IGF-1) a lo largo del período experimental. La aplicación de rbST incrementó el número de embriones transferibles ($p=0.09$), el número de embriones degenerados ($p<0.05$) y estructuras totales ($p<0.01$). Sin embargo, el número de ovocitos ($p=0.6$) y el porcentaje de gestación en las receptoras ($p>0.05$) fue similar entre tratamientos. En donadoras las concentraciones de IGF-1 e insulina se incrementaron después de la aplicación de rbST y fueron más altas ($p<0.05$) durante los días de muestreo, no así en las vacas receptoras. La aplicación de rbST incrementó las concentraciones de insulina e IGF-1 en donadoras Charolais mejorando la respuesta a la superestimulación, sin embargo, no afectó la tasa de gestación en vacas receptoras.

Palabras clave: somatotropina, insulina, IGF-1.

RECOMBINANT BOVINE SOMATOTROPIN AND EMBRYO SPLITTING VIABILITY

3.2 Abstract

Application of recombinant bovine somatotropin (rbST) at the time of bovine embryo transfer increases embryonic development in donor cows and improves pregnancy rates in recipient cows. Objectives of this study were to evaluate the effect of rbST application on the superovulatory response of Charolais donor cows, as well as on the pregnancy rates of recipient cows in an embryo splitting transfer program. Donors cows were divided in two groups: donor-rbST group (n=10) received 500 mg of rbST sc (Boostin®-S-Schering Plough) 48 h before artificial insemination (AI); and donor-control group (n=11) received 5 mL of saline solution im. The cows were flushed using a standard non-surgical technique 8 d after AI. Demiembryos derived from donor-rbST or the donor-control group were randomly transferred to recipient cows that received either 500 mg of rbST (recipient-rbST, n=50) or 5 mL of saline solution (recipient-control, n=53) at estrus. In donor and recipient cows, plasmatic concentrations of insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) were determined throughout the experimental period. The application of rbST increased the number of transferable embryos ($p=0.09$), degenerated embryos ($p<0.05$) and the number of total structures ($p<0.01$). However, the number of oocytes ($p=0.6$) and the pregnancy rate in the recipients were similar between treatments ($p>0.05$). IGF-1 and insulin concentrations increased after rbST application and were higher ($p<0.05$) during sampling days in donor cows, but not in the recipients. The rbST application increased insulin and IGF-1 concentrations in donor cows, improving the superovulatory response; however, it did not affect the pregnancy rates in recipient cows.

Key words: somatotropin, insulin, IGF-1.

3.3 Introducción

Las tecnologías reproductivas son herramientas potencialmente valiosas que ayudan a incrementar la eficiencia biológica y económica de las explotaciones de ganado para carne, en este sentido, la transferencia de embriones divididos es un método de reproducción artificial que consiste en la micromanipulación de embriones para ser divididos en dos medios embriones y producir mellizos idénticos, lo que permite incrementar el número de crías de hembras con un alto valor genético, acortar el intervalo generacional y en consecuencia, acelerar el mejoramiento genético de los hatos (Gordon, 2004).

La aplicación de rbST ha mostrado incrementar el número de embriones transferibles de vacas donadoras superestimuladas (Gonzalez *et al.*, 2004) y mejora la tasa de fertilidad cuando se aplica al momento de la inseminación (Mendoza, 2000) o antes de la transferencia (Moreira *et al.*, 2002a). La mayoría de los efectos de la rbST se llevan a cabo de manera directa, pero otros se realizan en forma indirecta a través de los factores de crecimiento parecidos a insulina tipo I (IGF-I) (Bauman, 1992). Estos efectos son mediados por el incremento en las concentraciones circulantes de IGF-1 e insulina en plasma (Gong *et al.*, 1993b), las cuales se incrementan de 24 a 48 h después del tratamiento con rbST (Gong *et al.*, 1991). Esto altera la dinámica folicular provocando un aumento en el número y crecimiento de folículos antrales en el ovario, con lo que se puede incrementar la respuesta a la superestimulación en vacas tratadas con rbST, además de modificar el ambiente uterino, favoreciendo las condiciones para el desarrollo embrionario temprano y el establecimiento de la preñez. Los objetivos del presente estudio fueron determinar el efecto de la aplicación de rbST 48 h antes de la inseminación artificial en la tasa de fertilización y desarrollo embrionario de vacas Charolais superestimuladas, y determinar el porcentaje de gestación de vacas receptoras tratadas o no con rbST en un programa de transferencia de embriones divididos.

3.4 Material y métodos

3.4.1 Localización

El estudio fue realizado durante los meses de junio a octubre de 2009 en la Granja Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en el Km 38.5 de la carretera México-Texcoco localizada a 19° 29" Latitud Norte y 98° 55" Longitud Oeste y 2250 msnm. El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano (C(w)(W)b(i)g), con una temperatura media anual de 15 °C siendo Mayo el mes más cálido y Enero el más frío, la precipitación es de 644.8 mm (García, 1991).

3.4.2 Animales, tratamientos y diseño experimental

Se utilizaron 21 vacas Charolais no lactantes de registro como donadoras, con una condición corporal promedio de 8 (escala de 1-10) de entre 3 y 8 años de edad. Las vacas donadoras fueron sincronizadas, superestimuladas y asignadas aleatoriamente a dos grupos: 1) aplicación subcutánea en la fosa isquiorectal de 500 mg de rbST 48 h antes de la IA (n=10); 2) aplicación intramuscular de 5 mL de suero salino fisiológico (SSF) o grupo control (n=11). El día 8 posterior a la IA se procedió a la recolección de los embriones en todas las donadoras. Los blastocistos calidad uno fueron divididos y transferidos a 103 vacas cruzas de Charolais no lactantes de entre 3 y 7 años de edad con una condición corporal promedio de 7. Los medios embriones provenientes de las vacas donadoras tratadas con rbST (donadoras-rbST) o de las vacas control (donadoras-control) fueron transferidos a las vacas receptoras que recibieron 500 mg de rbST (receptora-rbST, n=50) o a las receptoras control que recibieron 5 mL de SSF (receptora-control, n=53) al momento del celo. Bajo este protocolo se conformaron cuatro tratamientos experimentales: 1) donadora-rbST/receptora-rbST, n=26; 2) donadora-rbST/receptora-control, n=29; 3) donadora-control/receptora-rbST, n=24; y 4) donadora-control/receptora-control, n=24. El diseño experimental para la tasa de gestación fue un completamente al azar con arreglo factorial 2x2 donde los

factores fueron la receptora tratada o no con rbST y la donadora tratada o no con rbST y cada vaca fue la unidad experimental.

3.4.3 Manejo nutricional

Durante el experimento todas las vacas se encontraban bajo encierro total, alimentadas con una dieta elaborada para cubrir sus necesidades de mantenimiento, utilizando ensilado de maíz, heno de avena, una premezcla mineral comercial y agua *ad-libitum*.

3.4.4 Sincronización de estro, superestimulación y recolección de embriones en vacas donadoras

La sincronización del estro en las vacas donadoras se llevó a cabo bajo el siguiente protocolo: en el día cero se insertó un dispositivo intravaginal conteniendo 1.9 g de progesterona (CIDR[®], Pfizer) durante ocho días. En el día siete a las 19:00 h y el día ocho a las 7:00 h se aplicaron vía intramuscular 500 µg de prostaglandinas F_{2α} (PGF_{2α}; Celosil[®] Shering Plough), en el mismo día ocho a las 19:00 h, se retiró el dispositivo intravaginal a las vacas y se asignaron aleatoriamente a los dos grupos. La superestimulación se llevó a cabo del día cinco al día ocho de la sincronización, las vacas recibieron 300 mg de hormona folículo estimulante (FSH, Folltropin-V Bioniche, Animal Health, Canada, Inc) aplicando ocho dosis con un intervalo de 12 h en un protocolo descendente (60, 60, 50, 50, 30, 30, 10, 10 mg). La detección de celos se realizó permanentemente durante 72 h después de retirar el dispositivo intravaginal. Las donadoras fueron inseminadas 12 y 20 h después de detectado el celo con semen congelado proveniente de machos de fertilidad conocida.

La colección de los embriones se llevo a cabo entre el día 8 posterior a la IA mediante una técnica no quirúrgica utilizando un catéter de Folley No. 18 y medio para lavado (Complete Flush, Bioniche Animal Health, USA). Las estructuras se colectaron en un filtro EMCON (Immuno System, Inc Agtech Inc. USA) y posteriormente fueron clasificadas con ayuda de un microscopio

estereoscópico de acuerdo a su morfología y estadio de desarrollo con base en los estándares de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Strinfellow y Seidel 1998). Los blastocistos clasificados como calidad uno fueron manipulados, divididos y colocados en una pajilla de 0.25 mL para ser transferidos a las vacas receptoras de acuerdo al diseño experimental.

3.4.5 Sincronización de estro en vacas 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 que en este grupo de animales la aplicación de PGF₂ se realizó el día siete a las 19:00 h y los tratamientos con rbST o SSF se aplicaron 24 h posteriores a la remoción del CIDR. La transferencia se llevó a cabo inmediatamente después de dividir los embriones mediante un método no quirúrgico, colocándose un medio embrión en el tercio medio del cuerno ipsilateral al ovario donde se encontró el cuerpo lúteo (CL) en cada receptora.

3.4.6 Ultrasonografía

Todas las vacas se revisaron por un mismo operador los siguientes días: día cero, día de la inserción del CIDR, día 8: día de la remoción del CIDR, día 10: aparición del celo y registro del diámetro del folículo preovulatorio, el cual se obtuvo calculando el promedio del valor vertical y horizontal del folículo (Bush *et al.*, 2008), día 17: día de la transferencia y registro del diámetro del cuerpo lúteo con el mismo procedimiento utilizado para el diámetro del folículo preovulatorio. El diagnóstico de gestación se realizó 38 días posteriores a la transferencia mediante ultrasonografía transrectal (SONOVET 2000, Madison) con un transductor lineal de 7.5 MHz, el porcentaje de gestación se calculó dividiendo el número de hembras gestantes entre el número de hembras transferidas. Durante cada revisión se registró el número y diámetro de todos los folículos mayores a 5 mm y cuerpos lúteos presentes en cada ovario.

3.4.7 Determinaciones plasmáticas de insulina e IGF-1

Para determinar las concentraciones de insulina e IGF-1 se colectaron tres muestras de sangre de 14 donadoras y tres de 14 receptoras (7 tratadas con rbST y 7 con SSF para ambos grupos de vacas) los días -1, 4 y 10 en las donadoras y los días 6, 12 y 18 en las receptoras (día cero: aplicación de rbST) a través de punción de la vena yugular en tubos vacutainer de 7 mL. Una vez obtenida la sangre, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min, el suero obtenido se colocó en alícuotas y se almacenó a -20 °C para su posterior análisis. La concentración plasmática de IGF-1 se determinó mediante una prueba de radioinmunoanálisis (RIA) usando el Kit en fase sólida IGF1-RIACT (Cisbio Bioassays Gyf Sur Ivette, France) con una sensibilidad del ensayo de 1.0 ng/mL y un coeficiente de variación intra-ensayo de 15.6%. La concentración plasmática de insulina se determinó por medio de una prueba de RIA en fase sólida usando el Kit Porcine Insulin RIA Kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) con una sensibilidad de 0.091 ng/mL y un coeficiente de variación intra-ensayo de 15.7%.

3.4.8 Variables evaluadas

Para determinar el efecto de la rbST en las donadoras se evaluó la respuesta a la superestimulación en las siguientes variables: número de embriones transferibles, número de embriones degenerados, número de ovocitos y número de estructuras totales recolectadas; en las receptoras las variables registradas fueron: incidencia de celo, tiempo al celo, diámetro del folículo preovulatorio, diámetro del cuerpo lúteo presente siete días después del celo y el porcentaje de gestación 38 días post-transferencia, además de determinar la concentración en suero de IGF-1 e insulina tanto en donadoras como en receptoras tratadas o no con rbST.

3.4.9 Análisis estadístico

En las donadoras las variables continuas: embriones transferibles, embriones degenerados, ovocitos, estructuras totales, y en las receptoras: incidencia de

celo, tiempo al celo, diámetro del folículo preovulatorio y diámetro del cuerpo lúteo se analizaron mediante un diseño completamente al azar con el procedimiento GLM de SAS (2004), utilizando cada vaca como una unidad experimental, bajo el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde μ es la media poblacional, τ_i es el efecto del i-ésimo tratamiento (rbST ó SSF), y ε_{ij} es el error experimental del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición.

Los datos obtenidos de la variable discreta: porcentaje de gestación de las receptoras se analizó con el procedimiento GENMOD de SAS (2004) utilizando cada vaca como una unidad experimental, bajo el siguiente diseño factorial 2x2:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + R_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde μ es la media poblacional, D_i es el efecto del i-ésimo tratamiento (rbST ó SSF) en la donadora, R_j es el efecto del j-ésimo tratamiento (rbST ó SSF), en la receptora, y ε_{ij} es el error experimental del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición.

Las concentraciones de IGF-1 e insulina se analizaron por medio de un análisis de varianza para mediciones repetidas por el procedimiento REML del programa GEN STAT, tomando como variables fijas el día, el tratamiento y su interacción, y como variable aleatoria el animal dentro de tratamiento, utilizando el siguiente modelo experimental:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \delta_j + (\tau_i * \delta_j) + \varepsilon_{ij}$$

Donde μ es la media poblacional, τ_i es el efecto del i-ésimo tratamiento (rbST ó SSF), δ_j es el efecto del j-ésimo día (-1, 4, 10) en la donadora y (6, 12 y 18) en la receptora, $\tau_i * \delta_j$ es la posible interacción entre el tratamiento con el día, y ε_{ij} es el error experimental del i-ésimo tratamiento en el j-ésimo día.

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Respuesta a la superestimulación

En vacas Charolais superestimuladas se observó un incremento ($p<0.09$) en el número de embriones transferibles (ET), embriones degenerados (ED) ($p<0.05$) y estructuras totales (ST) ($p<0.01$) cuando se adicionó rbST, sin embargo, el número de ovocitos (OV) fue similar ($p=0.6$) entre tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Medias $\pm$ error estándar de embriones transferibles, embriones degenerados, ovocitos y estructuras totales de vacas donadoras Charolais tratadas o no con rbST.

Variable	Aplicación de rbST (500 mg)	
	Con (n=10)	Sin (n=11)
Embriones transferibles	6.9 $\pm$ 4.25 ^a	4.27 $\pm$ 2.41 ^b
Embriones degenerados	6.3 $\pm$ 5.39 ^c	2.72 $\pm$ 1.67 ^d
Ovocitos	3.0 $\pm$ 3.74 ^e	2.27 $\pm$ 2.45 ^e
Estructuras totales	16.2 $\pm$ 7.00 ^g	9.27 $\pm$ 3.46 ^h

Valores con diferente literal dentro de una hilera presentan diferencias significativas entre tratamientos ^{a,b} ($p<0.09$), ^{c,d} ($p<0.05$), ^{e,f} ($p=0.6$), ^{g,h} ($p<0.01$).

El número de ET fue mayor en el grupo de vacas tratadas con rbST, resultados similares han sido reportados por Cushman *et al.* (2001) quienes encontraron un mayor número de ET (6.1 vs 2.5, $p<0.01$) en vacas Angus tratadas catorcenalmente con somatotropina bovina (bST); de la misma forma en vacas Brahman superestimuladas tratadas con 500 mg de rbST al momento de la inseminación Gonzalez *et al.* (2004) reportaron un mayor porcentaje de ET (66 vs 79%, $p<0.01$). En tres experimentos donde se aplicó un pre-tratamiento con rbST al protocolo de superestimulación Gong *et al.* (1996) encontraron siempre una mayor cantidad de ET en las vacas tratadas con rbST (5.0 vs 10.8, $p<0.05$),

(1.5 vs 5.7, $p<0.01$) y (2.6 vs 6.3, $p<0.05$); en ovejas de pelo sometidas a un estímulo de ovulación múltiple se observó un incremento en la tasa de ET (54.6 vs 82.0%, $p<0.01$) cuando se adicionó rbST en el último día de la superestimulación (Navarrete *et al.*, 2008). Los incrementos en el número de ET han sido atribuidos a que la rbST estimula el desarrollo y maduración del folículo asociado con el aumento en las concentraciones periféricas de IGF-1 e insulina (Rieger *et al.*, 1991), favoreciendo al folículo que ha recibido el estímulo de la hormona folículo estimulante (FSH). En condiciones *in vitro*, la adición de hormona del crecimiento (GH) o IGF-1 al medio de cultivo incrementa la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto (Moreira *et al.*, 2002b; Kuzmina *et al.*, 2007). En el presente estudio la aplicación de rbST en el último día de la superestimulación incrementó las concentraciones de IGF-1 (Figura 1) e insulina (Figura 2).

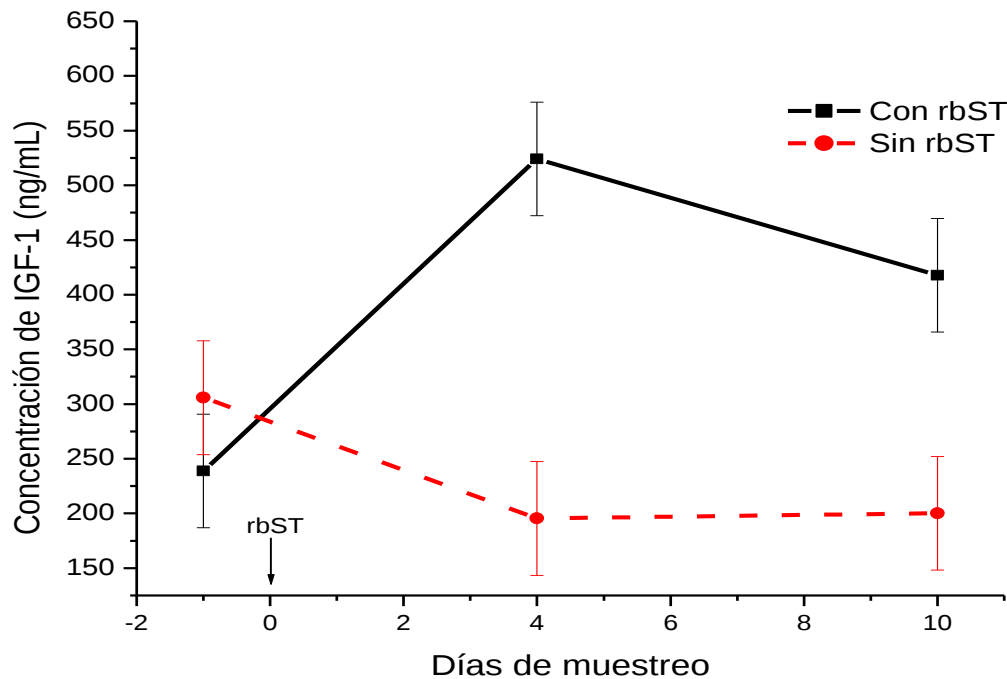


Figura 1. Concentración plasmática de IGF-1 en vacas donadoras

Las concentraciones de IGF-1 e insulina antes de la aplicación de rbST fueron similares entre tratamientos ($p>0.05$), sin embargo, se incrementaron después de la aplicación de la rbST, de tal manera que para el día cuatro posterior a la aplicación fueron diferentes ($p<0.05$) y se mantuvieron altas hasta por 7 días comparativamente con el grupo control, además de encontrar una interacción tratamiento X día ($p<0.001$) tanto para IGF-1 como para insulina, lo que concuerda con lo encontrado por Kuehner *et al.* (1993). Los incrementos de los IGF-1 e insulina pudieron favorecer la maduración del folículo ovulatorio y del ovocito. Se ha sugerido que los IGF-1 y la insulina juegan un papel importante en el control de la función ovárica (Webb y McBride, 1991).

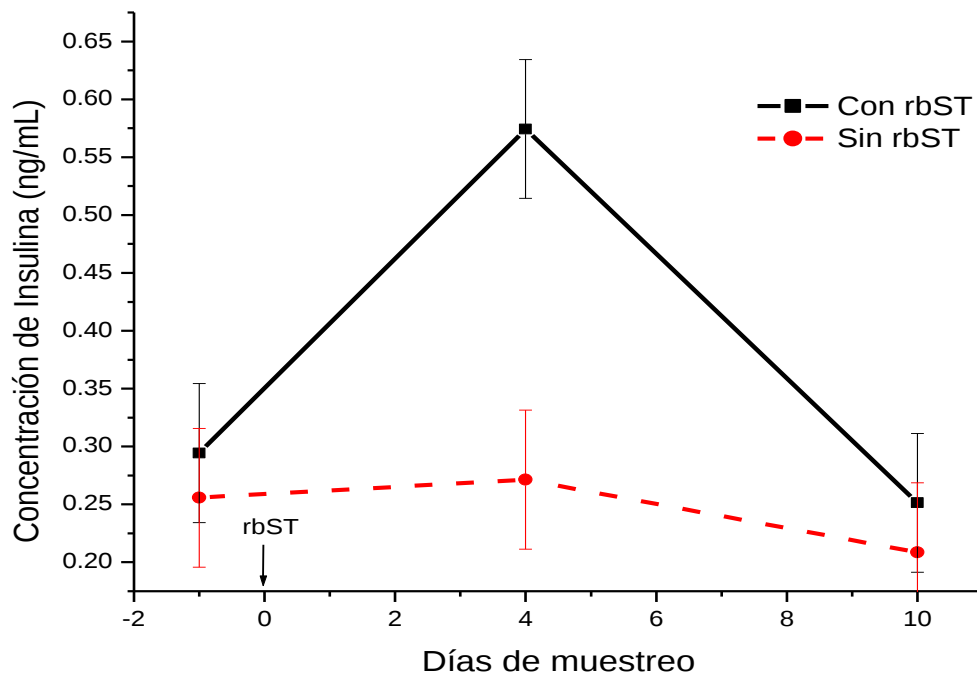


Figura 2. Concentración plasmática de insulina en vacas donadoras

Aunque el crecimiento antral es dependiente de las concentraciones de gonadotropinas, se ha demostrado que está influido por los IGF-1 y la insulina, además de que estimulan la proliferación en las células de la granulosa y la esteroidogénesis, por lo cual pueden favorecer la maduración del ovocito (Lee

et al., 2005) y su ausencia podría incrementar la atresia folicular (Silva y Price, 2002). Es posible que los IGF-1 e insulina actúen separadamente o en sinergia, y podrían estar involucradas en el incremento en la respuesta superestimuladora en este estudio.

Los resultados de esta investigación difieren de los encontrados por Morales (2000) y Moreira *et al.* (2002a) quienes no encontraron diferencias ($p>0.05$) en el porcentaje de ET al aplicar 500 mg de rbST o bST en vacas Holstein superestimuladas, de la misma manera Hasler *et al.* (2003) tampoco obtuvieron diferencias en el número de ET (5.9 vs 6.9, $p<0.26$) al aplicar 500 mg de rbST en vacas donadoras Angus. Al aplicar 320 (Gong *et al.*, 1993a) ó 640 mg de rbST (Herrler *et al.*, 1990) en los tratamientos superestimuladores con gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), el número de ET no fue diferente entre las vacas que recibieron o no rbST (3.8 vs 1.9, $p>0.05$).

Las concentraciones de IGF-1 e insulina se mantuvieron elevadas durante el periodo posterior a la IA, por lo cual, posiblemente favorecieron el desarrollo embrionario temprano. El efecto de la rbST en el desarrollo embrionario puede ser ejercido de forma directa (Izadyar *et al.*, 1997) o mediante su principal mediador, el IGF-1, estimulando el desarrollo, diferenciación y metabolismo del embrión antes de la implantación (Izadyar *et al.*, 2000). Watson *et al.* (1992) mencionan que el embrión bovino posee receptores para IGF-1, y la adición de IGF-1 mejora el desarrollo de embriones *in vitro* (Matsui *et al.*, 1995). La mejora en la calidad embrionaria puede deberse a un efecto de la rbST en la maduración del ovocito y la calidad del embrión en que este se convierte (Thatcher *et al.*, 1994). El tratamiento con rbST puede favorecer la calidad de los embriones al modificar el ambiente oviductal-uterino. Las células oviductales tienen la capacidad de secretar IGF-1 cuando al cultivo *in vitro* se le adiciona GH (Makarevich y Sirotkin, 1997). Al parecer el efecto positivo de la aplicación de rbST en los embriones es mediado por un aumento en las concentraciones de IGF-1 oviductal y probablemente uterino, lo que podría corregir en cierta

medida las deficiencias durante la fertilización, crecimiento, desarrollo y maduración del embrión (Lee *et al.*, 2005).

En el presente estudio la proporción de ED se incrementó ($p<0.05$) por la aplicación de rbST, contrastando con lo encontrado por Moreira *et al.* (2002a) quienes aunque obtuvieron un mayor número de ED en las vacas tratadas con bST, esta diferencia no fue significativa (0.3 vs 0.9, $p=0.23$). El número de ED entre las vacas tratadas con rbST y el grupo testigo fue similar ($p>0.37$) (Hasler *et al.*, 2003), en contraparte, Gonzalez *et al.* (2004) reportaron un menor porcentaje de ED (38 vs 17%, $p<0.05$) en las vacas tratadas con rbST. En ovejas, Folch *et al.* (2001) aplicaron 0.50 mg de hormona del crecimiento porcina (pGH) en el último día del tratamiento superestimulador, encontrando una menor proporción de ED ($p<0.01$) en las ovejas tratadas comparativamente con las no tratadas (5.4 vs 18.9%).

Monniaux *et al.* (1983) mencionan que la gran cantidad de folículos en vacas superestimuladas genera altas concentraciones de estrógenos, las cuales pueden ser responsables de la gran cantidad de embriones degenerados presentes en las recolecciones, lo cual ha sido asociado a una falla durante el desarrollo embrionario (Gong *et al.*, 1993a).

El número de OV obtenido en este estudio no fue diferente entre tratamientos ($p=0.6$), lo que concuerda con lo encontrado por Hasler *et al.* (2003) quienes reportaron un número de OV similar en vacas superestimuladas tratadas con 500 mg de rbST (3.1 vs 3.0, $p>0.37$). Sin embargo, Moreira *et al.* (2002a) encontraron un menor número de OV ($p<0.04$) en las vacas tratadas con rbST (1.0 vs 3.7%), por su parte, Gonzalez *et al.* (2004) reportaron un menor porcentaje de OV ($p<0.01$) en las vacas tratadas con rbST (27.0 vs 5.0%). Montero (2007), reportó una menor proporción de OV ($p<0.001$) en ovejas tratadas con bST comparativamente con el grupo testigo (14.3 vs 38.0%), de igual forma, Folch *et al.* (2001) encontraron una menor proporción de OV ($p<0.05$) en ovejas superestimuladas tratadas con pGH.

Las fallas en la fertilización han sido atribuidas a anormalidades en la maduración del ovocito y la asincronía entre el proceso de maduración del ovocito y el folículo, incluyendo el tiempo de ovulación como una consecuencia de la estimulación hormonal. Además, se han encontrado deficiencias en el transporte de los espermatozoides en los animales sometidos a ovulaciones múltiples, resultando en una disminución en el número de espermatozoides en el oviducto al momento de la fertilización (Armstrong y Xia, 1993). El incremento en las concentraciones de estrógenos en vacas superestimuladas podría causar una alteración en el patrón de movimientos del oviducto durante los primeros tres días post-inseminación, pudiendo alterar el transporte de los ovocitos al sitio de fertilización, por lo cual, parte de los ovocitos no llegan al útero reduciendo los porcentajes de recuperación (Monniaux *et al.* 1983). Aunque esta teoría no se pudo demostrar en este trabajo, ya que no se midieron las concentraciones de estrógenos en las donadoras.

Otras anormalidades en animales superestimulados pueden estar relacionadas con el aceleramiento en el desarrollo del folículo durante el periodo preovulatorio, ovulando antes de que los folículos hayan terminado su crecimiento y maduración para permitir la culminación de los procesos de maduración de las células de la granulosa o el ovocito (Armstrong y Xia, 1993).

En el presente estudio el número de ST fue mayor ($p<0.01$) en las vacas tratadas con rbST. Los resultados coinciden con los encontrados por Gong *et al.* (1993a), quienes reportaron una mayor cantidad de ST ($p<0.01$) en las vacas que recibieron rbST en un protocolo de superestimulación con PMSG (3.8 vs 7.4). Gong *et al.* (1996) en tres experimentos reportaron un incremento en el número de ST debido a la aplicación de rbST (6.0 vs 11.8, $p<0.05$), (3.2 vs 5.8, $p=0.09$) y (3.7 vs 7.2, $p=0.08$). Sin embargo, los resultados de otras investigaciones contrastan con los reportados en este trabajo, Molina (2000) encontró un número similar ($p=0.61$) de ST al aplicar bST en vacas cebuinas superestimuladas en las estaciones de secas y lluvias. De igual forma, Kuehner *et al.* (1993) al aplicar 500 mg de rbST en vaquillas Holstein superestimuladas y

Herrler *et al.* (1990) en vacas Holstein tratadas con 640 mg de bST en un protocolo de superestimulación con PMSG, no encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control.

El incremento en el número de ST puede deberse a los cambios que ocurren en el metabolismo de la vaca después del tratamiento con rbST. La aplicación de rbST aumenta las concentraciones periféricas de GH en las siguientes 24 h (Gong *et al.*, 1993b) y permanecen significativamente altas hasta por siete días. El aumento de los IGF-1 se presenta aproximadamente 48 h después del incremento en las concentraciones de GH, los cuales pueden mantenerse elevados hasta por ocho días (Gong *et al.*, 1993a). Los incrementos tanto en GH como en los IGF-1 pueden rescatar algunos folículos de la atresia y permitir su desarrollo (Rieger *et al.*, 1991). El mayor número de folículos pequeños (<5 mm) se detecta aproximadamente 24 h después del aumento en las concentraciones periféricas de GH, IGF-1 e insulina (Gong *et al.*, 1993b), aunque el tratamiento con rbST también tiene un efecto positivo en los folículos medianos (5-9 mm) y grandes (>10 mm) presentes en cada onda folicular (De la Sota *et al.*, 1993). Gong *et al.* (1993a) aplicaron 320 mg de rbST durante dos ciclos estrales en vaquillas, encontrando un aumento en la población de folículos antrales de 2-5 mm, el cual fue asociado con un incremento en las concentraciones de IGF-1. En la presente investigación las concentraciones de IGF-1 se incrementaron posterior a la aplicación de rbST ($p<0.05$) y se mantuvieron significativamente altas hasta el día 8, día de la colección de embriones, por lo que podría especularse que incrementó el número de folículos y por consiguiente el número de ST.

3.5.2 Respuesta en las receptoras

La aplicación de 500 mg de rbST 24 h después de la remoción del CIDR no afectó la incidencia de celo (IC), el tiempo al celo (TC), el diámetro del folículo preovulatorio (DFP) y el porcentaje de gestación (TG) de vacas receptoras en un protocolo de sincronización de celos, sin embargo, el diámetro del cuerpo lúteo (DCL) fue mayor ($p=0.08$) en las vacas tratadas con rbST (Cuadro 4).

Pocos estudios se han enfocado en la relación de la rbST y las características de estro en vacas para producción de carne o leche (Morbeck *et al.*, 1991; Cole *et al.*, 1992; Kirby *et al.*, 1997). Los resultados de esta investigación concuerdan con lo reportado por Flores *et al.* (2007) quienes no encontraron diferencias en la aparición de celo ($p=0.07$) en vacas cebuínas tratadas con 500 mg de bST mantenidas en diferente condición corporal. La aplicación de bST en vacas primíparas no afectó el porcentaje de celos, sin embargo, en vacas multíparas tendió a reducirlo (64.7 vs 79.6%, $p= 0.10$) (Santos *et al.*, 2004).

Cuadro 4. Influencia de la aplicación de rbST en las características del estro y el porcentaje de gestación de vacas receptoras.

Variable	Aplicación de rbST (500 mg)	
	Con (n=50)	Sin (n=53)
Incidencia de celo (%)	95.0 ^a	88.1 ^a
Tiempo al celo (h)	50.6 ^a	45.05 ^a
Diámetro del folículo preovulatorio (mm)*	12.8 ± 2.82 ^a	12.6 ± 2.79 ^a
Diámetro del cuerpo lúteo (mm)*	17.4 ± 6.20 ^a	14.9 ± 6.70 ^b
Porcentaje de gestación	22.0 ^x	24.5 ^y

Valores con diferente literal dentro de cada hilera presentan diferencias significativas entre tratamientos ^{a,b} ($P<0.1$), ^{x,y} ($P<0.05$). *Medias (± error estándar)

El tratamiento con 500 mg de bST cada 14 días redujo el porcentaje de estros en vacas Holstein (Kirby *et al.*, 1997). Morbeck *et al.* (1991) demostraron que el tratamiento con 16.5 mg/día de bST iniciando cinco semanas post-parto incrementó el intervalo del parto al primer estro. Por su parte, Waterman *et al.* (1993) encontraron una disminución en la expresión del estro de 18% en vacas Holstein tratadas con 40 mg de bST al día (81 vs 63%, $p=0.34$), sin embargo, las diferencias no fueron significativas. Es posible que la bST pudiera estar influenciando los centros de comportamiento del cerebro que controlan la expresión del estro, disminuyendo el comportamiento estral (Lefebvre y Block, 1992).

La aplicación de rbST no provocó cambios ($p=0.84$) en el DFP de las vacas utilizadas en este trabajo, hasta el momento no se ha encontrado información en la cual se analice el efecto de la rbST en el DFP en vacas. Sin embargo, estudios en ratas demostraron que la aplicación de bST disminuyó la tasa de apoptosis de los folículos preovulatorios, aparentemente a través de una acción mediada por los IGF's (Eisenhauer *et al.*, 1993).

La aplicación de rbST 24 h después de retirar el dispositivo intravaginal provocó un incremento en el DCL medido siete días después del celo, en concordancia con otros autores quienes encontraron que la rbST estimula el crecimiento y la función del CL (Lucy *et al.*, 1999). La aplicación de 25 mg/día de rbST durante 16 días a partir del inicio del celo en vacas lecheras incrementó (9.3 vs 5.8 g, $p<0.001$) el peso del CL (Lucy *et al.*, 1995).

En diversos estudios se ha observado que la GH y los IGF-1 estimulan la función del CL (Lucy *et al.*, 1993), la GH estimula la producción de progesterona del CL (Lucy *et al.*, 1995) ya que las células grandes del CL poseen receptores para la GH, los cuales responden al estímulo de esta hormona. Los animales que recibieron rbST durante los primeros 10 días del ciclo mostraron una producción de progesterona significativamente mayor (Schemm *et al.*, 1990), desarrollaron más rápidamente el CL, presentaron CL más pesados y tuvieron una luteólisis más retardada comparativamente con animales no tratados (Lucy *et al.*, 1995, 1999). La estimulación de la GH en la función lútea puede ser directa ya que las células grandes del CL poseen una gran cantidad de receptores para ella (Spicer y Stewart, 1996), y la cantidad de ARNm para los receptores de GH es mayor en el CL que en ningún otro tejido reproductivo (Kirby *et al.*, 1997).

La aplicación de rbST aumenta las concentraciones periféricas de GH (Gong *et al.*, 1993b) y posteriormente las concentraciones de IGF-1 (Gong *et al.*, 1993a). Los IGF-1 son estimuladores del crecimiento folicular, proliferación y diferenciación celular y al mismo tiempo amplifican la acción de las gonadotropinas en las células foliculares (Gutierrez *et al.*, 1997), sin embargo,

en el presente estudio la aplicación de rbST sólo aumentó el diámetro del cuerpo lúteo.

En el presente estudio el porcentaje de gestación de vacas receptoras no se vio afectada por la aplicación de rbST ($p>0.05$), el porcentaje de gestación obtenido 38 días post transferencia se presenta en el Cuadro 5. Los resultados indican que no hubo diferencias ($p<0.05$) entre las receptoras control y las receptoras tratadas con rbST y no se encontró interacción alguna ($p>0.05$). Resultados similares fueron encontrados por Marques (2006), quien al transferir embriones completos descongelados en vacas cebuínas tratadas con 250 y 500 mg de bST encontró un porcentaje de gestación similar (52.5 vs 45.3%, $p>0.05$) entre las vacas tratadas comparativamente con el grupo testigo. Por su parte, Calderón *et al.* (2007) realizaron un estudio con vacas productoras de carne en un protocolo de inseminación a tiempo fijo, a las cuales aplicaron catorcenalmente 500 mg de rbST durante las épocas de primavera y otoño, no encontrando diferencias en el porcentaje de gestación (50 vs 43%). Sin embargo, en otro trabajo Marques (2006) al transferir embriones completos encontró un mayor porcentaje de gestación ($p<0.01$) en receptoras cebuínas tratadas con 530 mg de rbST al momento del estro (65.7 vs 32.5%).

Cuadro 5. Tasa de gestación de receptoras tratadas o no con rbST, transferidas con un medio embrión procedente de una donadora tratada o no con rbST

Tratamiento	Número de vacas	Gestantes	Gestación (%)
donadora-rbST/receptora-rbST	26	8	30.8 ^a
donadora-rbST/receptora-control	29	8	27.6 ^a
donadora-control/receptora-rbST	24	3	12.5 ^a
donadora-control/receptora-control	24	5	20.8 ^a

Valores con diferente literal dentro de cada hilera presentan diferencias significativas entre tratamientos ^{a,b} ($P<0.05$).

De igual forma, Moreira *et al.* (2002a) reportaron un porcentaje de gestación mayor ($p<0.04$) al transferir embriones completos en vacas Holstein tratadas

con 500 mg de bST un día después del estro (43.3 vs 25.6%). Se ha investigado con mayor énfasis la receptora y su influencia en el porcentaje de preñez, relacionándola con la raza, edad, estado sanitario, nivel nutricional y productivo (Wilmot *et al.*, 1985; Mapletoft *et al.*, 1990). El éxito en la transferencia de embriones divididos depende entre otros factores del método de división (Mertes y Bondioli, 1985), tipo de embrión, edad y estadio de desarrollo (McEvoy y Sreenan, 1990) entre otros son factores que predisponen el éxito en la transferencia, en el presente estudio se transfirieron embriones divididos, lo cual pudo haber afectado el porcentaje de gestación sin observar algún efecto positivo por la aplicación de rbST.

El mecanismo por el cual la rbST ha mejorado la fertilidad en otros estudios está relacionado ya sea con los efectos directos de la GH, ó indirectos mediados por el IGF-1 en los procesos reproductivos (Rodríguez *et al.*, 2009).

Las concentraciones plasmáticas de insulina fueron diferentes ($p < 0.05$) entre tratamientos el día 6 posterior a la aplicación de rbST (Figura 3) y fueron disminuyendo paulatinamente hasta alcanzar concentraciones incluso inferiores a las de las vacas control, no así para los días 12 y 18. Sin embargo, el incremento en las concentraciones de insulina no se reflejó en un aumento en la tasa de preñez de las receptoras. Hay dos etapas fisiológicas en las cuales la GH, la insulina y los IGF-1 ejercen su efecto, y corresponden a las etapas en que ocurren la mayor parte de las pérdidas embrionarias (Mann *et al.*, 1999). La primera corresponde a la fertilización y el desarrollo embrionario durante los primeros siete días. Así, en estudios *in vivo* la aplicación de bST al momento del servicio aumenta el porcentaje de ovocitos fertilizados y la proporción de embriones transferibles (Morales, 2000; Moreira *et al.*, 2002a).

La insulina desempeña un papel importante en el desarrollo embrionario temprano (Boland *et al.*, 2001), en embriones bovinos cultivados *in vitro* ejerce un efecto mitogénico y antiapoptótico (Augustin *et al.*, 2003), lo que resulta en un aumento en la proporción de embriones que desarrollan hasta la etapa de blastocisto.

El efecto de la bST en el embrión puede ser directo o mediado por IGF-1 e insulina, ya que el embrión posee receptores para estas hormonas (Izadyar *et al.*, 2000); por otro lado, existen receptores para bST e IGF-1 en el endometrio de vacas cíclicas, además de una gran cantidad de receptores para IGF-1 en las glándulas epiteliales.

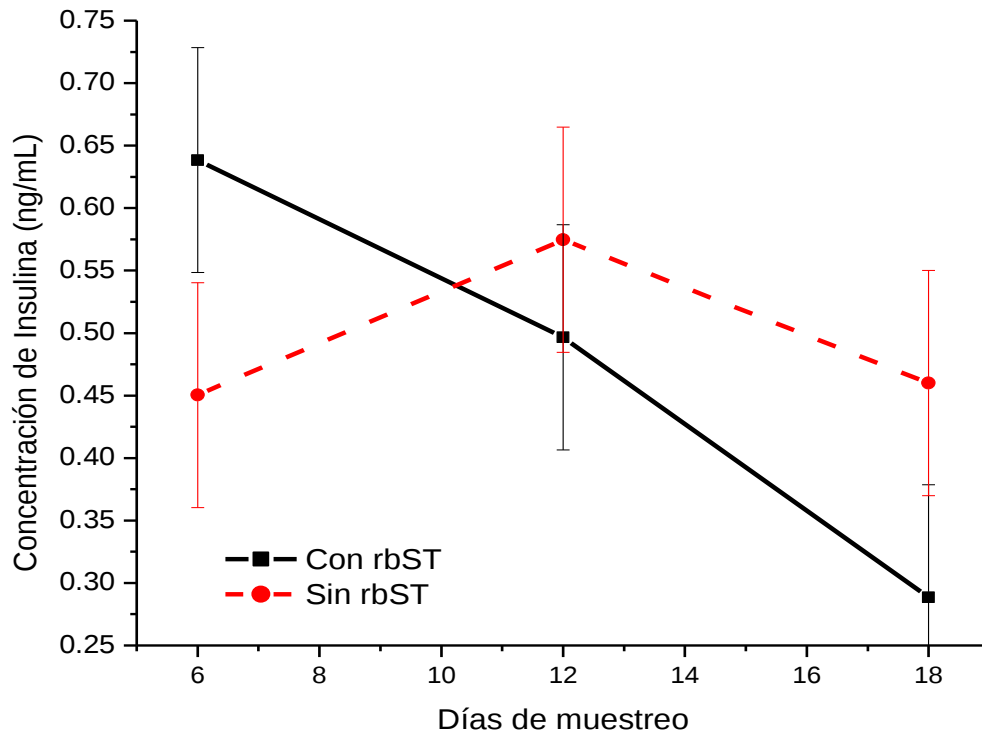


Figura 3. Concentración plasmática de insulina en vacas receptoras

Un incremento en las concentraciones circulantes de GH e IGF-1 como consecuencia del tratamiento con rbST, puede estimular la actividad secretora de las glándulas endometriales y mejorar el ambiente uterino para mantener la preñez (Persching *et al.*, 2002). Por otro lado, la bST disminuye la sensibilidad del mecanismo de secreción de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ mediante la disminución de la actividad de la enzima ciclooxigenasa en las células del endometrio, e incrementa la síntesis de interferon tau (Bilby *et al.*, 2004), lo que puede favorecer el rescate del cuerpo lúteo (Mann *et al.*, 1999).

En el presente estudio, en el día seis posterior a la aplicación de rbST, la concentración de IGF-1 fue más alta ($p<0.01$) en las vacas receptoras que recibieron el tratamiento con rbST (Figura 4), mientras que para los días 12 y 18 no fue así. Podría especularse que las concentraciones de IGF-1 se incrementaron después de la aplicación de rbST y para el día 6 ya eran diferentes, posteriormente fueron disminuyendo hasta alcanzar concentraciones similares a las de las vacas control.

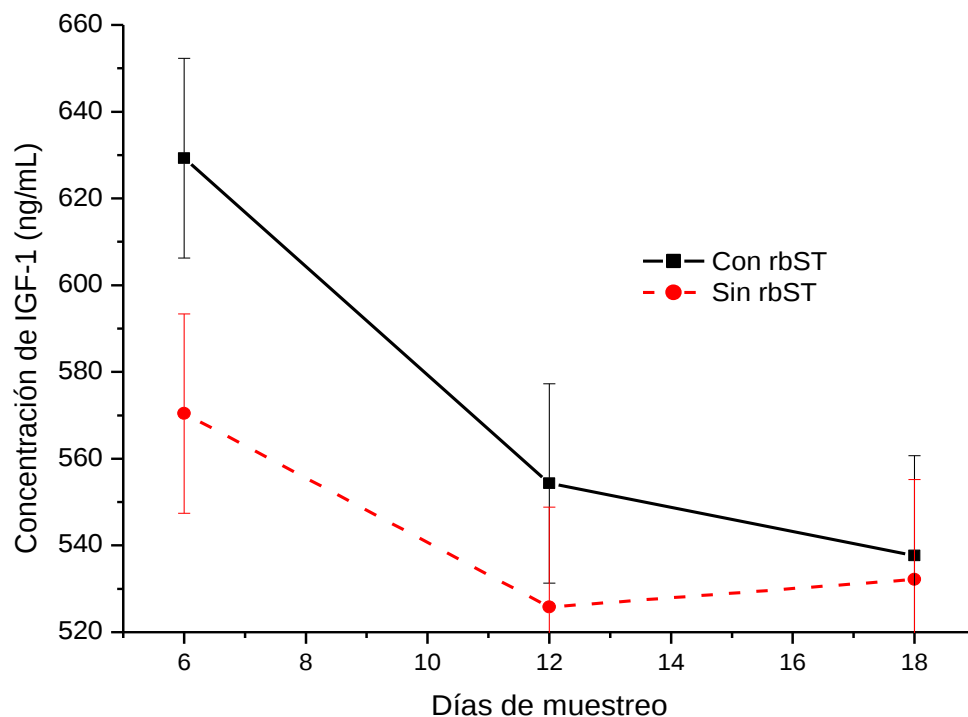


Figura 4. Concentración plasmática de IGF-1 en vacas receptoras

El incremento fue importante solo para la etapa donde se da la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Mann *et al.*, 1999), de este modo, a pesar de un posible efecto benéfico de la rbST en la producción de IGF-1 en los primeros días post aplicación, el porcentaje de gestación en las vacas que recibieron un embrión aproximadamente ocho días después de la aplicación de rbST, cuando las concentraciones de IGF-1 se encontraban en disminución, no se vio

alterado. Algunos autores han establecido que la aplicación de rbST cada 14 días mantiene las concentraciones de IGF-1 constantemente altos (Jousan *et al.*, 2007). En este trabajo se aplicó una sola dosis de rbST lo que provocó un incremento en las concentraciones de IGF-1 que posteriormente fueron disminuyendo hasta alcanzar sus concentraciones basales.

En la actualidad no existe información acerca del uso de la rbST en la transferencia de embriones divididos, por lo tanto es necesario realizar más investigación sobre el tema. Estudios previos han mostrado que la tasa de preñez en vacas lactantes se incrementa cuando se aplica bST al inicio del protocolo de sincronización o cercano al momento de la inseminación artificial a tiempo fijo (Moreira *et al.*, 2002a; Santos *et al.*, 2004). Estas diferencias en la respuesta pueden reflejar la compleja relación entre la fisiología y el estado nutricional y reproductivo de las vacas (Bilby *et al.*, 2004).

3.6 Conclusión

La aplicación de rbST incrementa las concentraciones de insulina e IGF-1 en vacas donadoras Charolais mejorando la respuesta a la superestimulación, sin embargo, no altera las características del estro ni la tasa de gestación en vacas receptoras.

3.7 Literatura citada

- Armstrong, T. D., and P. Xia. 1993. Differential mitogenic actions of insulin-like growth factor-1 and FSH in bovine cumulus cells and granulosa cells. *Theriogenology* 39: 181.
- Augustin, R., P. Pocar, C. Wrenzycki, H. Niemann, and B. Fischer. 2003. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction* 126: 91-99.
- Bauman, D. E. 1992. Bovine somatotropin: Review of an emerging animal technology. *Journal of Dairy Science* 75: 3432-3451.
- Bilby, T. R., A. Guzeloglu, S. Kamimura, S. M. Pancarci, F. Michel, H. H. Head, and W. W. Thatcher. 2004. Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus, and insuline like growth factor system responses. *Journal of Dairy Science* 87: 3256-3267.

- Boland M. P., P. Lonergan, and D. O'callaghann. 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55: 1323-1340.
- Calderón, G., M. Tamassia, and S. Clark. 2007. Effects of rbST on pregnancy rates of beef cows synchronized with a Cosynch-CIDR protocol and inseminated at fixed time. *Theriogenology* 68: 507.
- Cole, W. J., P. J. Eppard, B. G. Boysen, K. S. Madsen, R. H. Sorbet, M. A. Miller, R. L. Hintz, T. C. White, W. E. Ribelin, and B.G. Hammond. 1992. Response of dairy cows to high doses of a sustained-release bovine somatotropin administered during two lactations. *Journal of Dairy Science* 75: 111-123.
- Cushman, R. A., J. C. Desouza, V. S. Hedgpeth, and J. H. Britt. 2001. Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. *Theriogenology* 55: 1533-1547.
- De la Sota, R. L., M. C. Lucy, C. R. Staples, and W. W. Thatcher. 1993. Effect of recombinant bovine somatotropin (Sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76: 1002-1013.
- Eisenhauer, K., M., S. Y. Chun, H. Billig, and A. J. Hsueh. 1993. Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. *Biology of Reproduction* 53: 13-20.
- Flores, R., M. L. Looper, L. W. Rorie, M. A. Lamb, S. T. Reiter, D. M. Hallford, D. L. Kreider, and C. F. Rosenkrans Jr. 2007. Influence of body conditions and bovine somatotropin on estrous behavior, reproductive performance, and concentration of serum somatotropin and plasma fatty acids in postpartum Brahman-influenced cows. *Journal of Animal Science* 85:1318-1329.
- Folch, J., J. P. Ramon, M. J. Cocero, J. L. Alabart, and J. F. Beckers. 2001. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology* 55: 1777-1785.
- García E.1991. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koeppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 27p.
- Gong, J. G., T. A. Bramley, I. Wilmut, and R. Webb. 1991. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: Follicular populations and peripheral hormones. *Biology of Reproduction* 45: 941-949.
- Gong, J. G., T. A. Bramley, I. Wilmut, and R. Webb. 1993a. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to

- pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biology of Reproduction* 48: 1141-1149.
- Gong, J. G., T. A. Bramley, and R. Webb. 1993b. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 97: 247-254.
- Gong, J. G., I. Wilmut, T. A. Bramley, and R. Webb. 1996. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* 45: 611-622.
- Gonzalez, F. R., J.C. Velarde, F. P. Ganchou, E. S. Belloso R. P. Naveda, and H. H. Fonseca. 2004. Production of transferable embryos in Brahman cows treated with bovine somatotropin. *Reproduction, Fertility and Development* 16: 210.
- Gordon I. 2004. *Tecnología de la Reproducción de los Animales de Granja*. Ed. Acibia, S.A. pp: 23-45.
- Gutierrez, C. G. B. K. Campbell, and R. Webb. 1997. Development of a long term bovine granulosa cell culture system: Induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristic. *Biology of Reproduction* 56: 608-616.
- Hasler, J., F., C. R. Bilby, R. J. Collier, S. C. Denham, and M. C. Lucy. 2003. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology* 59: 1919-1928.
- Herrler, A., E. Farries, and H. Niemann. 1990. A trial to stimulate insulin like growth factor-1 levels to improve superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology* 33: 248-254.
- Izadyar, F., B. Colenbrander, and M. M. Bevers. 1997. Growth hormone enhances fertilizability of in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology* 47: 191-204.
- Izadyar, F., H. T. A. Van Tol, W. G. Hage, and M. M. Bevers. 2000. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development. *Molecular Reproduction and Development* 57: 247-255.
- Jousan, F. D., L. A. E. P. De Castro, J. Block, and P. J. Hansen. 2007. Fertility of lactating dairy cows administered recombinant bovine somatotropin during heat stress. *Journal of Dairy Science* 90: 341-351.
- Kirby, C. J., S. J. Wilson, and M. C. Lucy. 1997. Response of dairy cows treated with bovine somatotropin to a luteolytic dose of prostaglandin F_{2α}. *Journal of Dairy Science* 80: 286-294.
- Kuehner, L. F., D. Rieger, J. S. Walton, X. Zhao, and W. H. Johnson. 1993. The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular

- development and embryo yield in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 40: 1003-1013.
- Kuzmina, T. I., A. L. M. Hannelor, V. Denisenko, A. Tuchscherer, W. Kanitz, and H. Torner. 2007. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on cytoplasmic maturation on bovine oocytes and their developmental competence *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development* 53: 309-316.
- Lee, M. S., S. K. Kang, B. C. Lee, and W. S. Hwang. 2005. The beneficial effects of insulin and metformin on *in vitro* developmental potential of porcine oocytes and embryos. *Biology of Reproduction* 73: 1264-1268.
- Lefebvre, D. M., and E. Block. 1992. Effect of recombinant bovine somatotropin on Estradiol-Induced estrous behavior in ovariectomized heifers. *Journal of Dairy Science* 75: 1461-1464.
- Lucy, M. C., R. J. Collier, M. L. Kitchell, J. J. Dibner, D. S. Hauser, and G. G. Krivi. 1993. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biology of Reproduction* 48: 1219-1227.
- Lucy C., M., W. Thatcher W., R. Collier J., F. Simmen A., Y. Ko, J. Savio D., and L. Badinga. 1995. Effects of somatotropin on the conceptus uterus and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 12: 73-82.
- Lucy, M. C., R. C. Bilby, J. C. Kirby, W. Yuan, and K. C. Boyd. 1999. Role of growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora lutea. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 49-59.
- Makarevich, A. V., and A. V. Sirotkin. 1997. The involvement of the GH/IGF-1 axis in the regulation of secretory activity by bovine oviduct epithelial cells. *Animal Reproduction Science* 48: 197-207.
- McEvoy, T. G., and J. M. Sreenan. 1990. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of zona pellucida-free cattle demy embryos. *Theriogenology* 33: 1245-1253.
- Mapletoft, R., J., V. Pawlyshyn, A. García, G. A. Bo, and J. Willmott. 1990. Comparison of four different gonadotropin treatments for inducing superovulating in cows with 1:29 translocation. *Theriogenology* 33: 282.
- Marques, F., P., A. 2006. Influencia da somatotropina recombinante bovina (rbST) aplicada em receptores de embriões bovinos, no dia do estro, sobre variáveis reprodutivas. Tesis de Maestría. Universidad Federal de Viosa. 56 p.
- Matsui, M. Y., Takahashi, M. Hishinuma, and H. Kanagawa. 1995. Insulin and insulin like growth factor -1 (IGF-1) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *Journal of Veterinary Medical Science* 57: 1109-1111.

- Mann, G. E., G. E. Lamming, R. S. Robinson, and D. C. Wathes. 1999. The regulation of interferon tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 317-328.
- Mendoza M., G. 2000. Efecto de una dosis de 500 mg de somatotropina bovina recombinante (rbST) en la fertilidad de vacas Holstein al primer servicio y repetidoras. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 55 p.
- Mertes, P. C., and K. R. Bondioli. 1985. Effect of splitting technique on pregnancy rate from half embryos. *Theriogenology* 23: 209-212.
- Molina, E., J., J. 2000. Efecto de la adición de somatotropina bovina al tratamiento de Folltropin-V sobre la respuesta superovulatoria y cantidad de embriones transferibles en vacas cebuínas superovuladas en dos épocas de año en el trópico húmedo mexicano. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 68 p.
- Monniaux, D., D. Chupin, and J. Saumande. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19: 55-82.
- Montero P., A. 2007. Efecto de la administración de bST cinco días antes del retiro de la esponja de FGA en el desarrollo embrionario temprano de ovejas superovuladas. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 89 p.
- Morales R., J. S. 2000. Efecto de un tratamiento corto de somatotropina bovina sobre niveles hormonales, actividad ovárica y desarrollo embrionario en hembras Holstein. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 68 p.
- Moreira, F., L. Bandinga, C. Burnley, and W. W. Thatcher. 2002a. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 57: 1371-1387.
- Moreira, F., F. F. Lopes, O. J. Hansen, L. Bandinga, and W. W. Thatcher. 2002b. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 57: 895-907.
- Morbeck, D. E., J. H. Britt, and B. T. McDaniel. 1991. Relationships among milk yield, metabolism, and reproductive performance of primiparous Holstein cows treated with somatotropin. *Journal of Dairy Science* 74:2153-2164.
- Navarrete, S. L. F., T. A. Cruz, P. E. I. González, R. E. Piña, J. R. Sangines, V. L. Toledo, and J. P. Ramón. 2008. Effect of recombinant growth hormone (rbST) application on superovulatory response and embryo viability in hair ewes. *Revista científica, FCV. LUZ* 18:175-179.
- Pershing, R. A. M. C. Lucy, W. W. Thatcher, and L. Bandinga. 2002. Effect of bST on oviductal and uterine genes encoding components of the IGF system in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85: 3260-3267.

- Rieger, D., J. S. Walton, M. L. Goodwin, and W. H. Johnson 1991. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotropin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 35: 863-868.
- Rodríguez C., O. A., B. Díaz R., O. González O., C. G., Gutiérrez, H. Montaldo H., G. Ortiz C., y H. Cerón J. 2009. Porcentaje de gestación al primer servicio en vacas Holstein tratadas con hormona bovina del crecimiento en la inseminación. *Veterinaria México* 40: 1-7.
- Santos, J. E. P., S. O. Juchem, R. L. A. Cerri, K. N. Galvão, R. C. Chebel, W. W. Thatcher, C. S. Dei, and C. R. Bilby. 2004. Effect of bST and reproductive management of reproductive performance of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87: 868-881.
- SAS. 2004 SAS/STAT User's Guide. (Release 9.1). SAS Publishing. Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Schemm, S. R., D. R. Deaver, L. C. Griel Jr., and L. D. Muller. 1990. Effects of recombinant bovine somatotropin on luteinizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. *Biology of Reproduction* 42: 815-821.
- Silva, J. M., and C. A. Price. 2002. Insulin and IGF-1 are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells *in vitro*. *Journal of Endocrinology* 174: 499-507.
- Spicer, L. J., and R. E. Stewart. 1996. Interaction among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and insulin like growth factor-1 (IGF-1) on cell numbers and steroidogenesis of bovine theca cells: role of IGF-1 receptors. *Biology of Reproduction* 54: 255-263.
- Strinfellow, D. A., and S. M. Seidel. 1998. Manual of the International Embryo Transfer Society. International Embryo Transfer Society. Savoy, Illinois. pp: 51-66.
- Thatcher, W. W., C. R. Staples, G. Danet-Desnoyers, B. Oldick, and E. P. Schmit. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *Journal of Animal Science* 72: 16-30.
- Waterman, D. F., W. J. Silvia, R. W. Hemken G. Heersche Jr., T. S. Swenson, and R. G. Eggert. 1993 Effect of bovine somatotropin on reproductive function in lactating dairy cows. *Theriogenology* 40: 1015-1028.
- Watson, A. J., A. Hogan, A. Hahnel, H. E. Wiemer, and G. A. Schultz. 1992. Expression of growth factor ligand the receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Molecular Reproduction and Development* 31: 87-95.
- Webb, R., and D. McBride. 1991. Control of the proliferation of granulosa cells from small ovine follicles. *Journal of Reproduction and Fertility* 43: 229-230.

Wilmut, I., D. I. Sales, and C. J. Ashworth. 1985. The influence of variation in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo survival in farm animals. *Theriogenology* 23: 107-119.