



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

RESPUESTA SUPERESTIMULATORIA DE VAQUILLAS HOLSTEIN TRATADAS CON DOS DOSIS DE SOMATOTROPINA

TESIS

Que como requisito parcial

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta

JUAN GONZÁLEZ MALDONADO

Bajo la supervisión de Raymundo Rangel Santos, Ph.D



Mayo 2013

Chapingo, Estado de México



RESPUESTA SUPERESTIMULATORIA DE VAQUILLAS
HOLSTEIN TRATADAS CON DOS DOSIS DE SOMATOTROPINA

Tesis realizada por JUAN GONZÁLEZ MALDONADO 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: RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA
Ph.D. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

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

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2	REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1	Estrés calórico y reproducción animal	2
2.2	Ciclo estral y calidad del ovocito durante periodos de estrés calórico ..	4
2.3	Secuelas del estrés calórico sobre la viabilidad del embrión	6
2.4	Implicaciones del estrés calórico y oxidativo en la muerte celular	7
2.5	Superestimulación ovárica del ganado bovino.....	9
2.6	Somatotropina y metabolismo	13
2.7	Somatotropina y fisiología animal bajo estrés calórico	14
2.8	Progesterona y reproducción animal durante estrés calórico	16
2.9	Insulina y reproducción del animal durante estrés calórico.....	21
2.10	Factor análogo a insulina tipo I y reproducción del animal	26
2.11	Literatura citada	34
3	RESPUESTA SUPERESTIMULATORIA DE VAQUILLAS HOLSTEIN TRATADAS CON DOS DOSIS DE SOMATOTROPINA.....	62
3.1	Resumen	62
3.2	Abstract.....	63
3.3	Introducción	64
3.4	Materiales y métodos.....	66
3.4.1	Localización	66
3.4.2	Animales.....	66
3.4.3	Tratamiento y diseño experimental.....	66
3.4.4	Sincronización de celos y programa de superestimulación	67
3.4.5	Evaluación y transferencia de embriones	68
3.4.6	Variables de respuesta	70
3.4.7	Análisis estadístico	70

3.5	Resultados y discusión	71
3.6	Conclusión	79
3.7	Literatura citada	80

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto de la aplicación de somatotropina sobre la producción de embriones.....	15
Cuadro 2. Efecto de la aplicación de somatotropina sobre la dinámica folicular.	32
Cuadro 3. Efecto de la aplicación de somatotropina sobre la fertilidad.....	33
Cuadro 4. Respuesta ovulatoria de vaquillas Holstein tratadas con una (rbST-I) o dos (rbST-II) dosis de 500 mg de rbST ((número de animales) porcentaje promedio $\pm$ error estándar).....	74
Cuadro 5. Medias $\pm$ error estándar del diámetro del folículo preovulatorio más grande, ovocitos, embriones degenerados y transferibles de vaquillas Holstein tratadas con una (rbST-I) o dos (rbST-II) dosis de 500 mg de rbST.	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo de superestimulación en donadoras (a) y sincronización de celos en receptoras (b).....	69
Figura 2. Índice de temperatura y humedad durante los meses de junio (líneas sólidas con círculos) y septiembre (líneas sólidas con cuadrados). El día cero representa el día del celo.	72

ABREVIATURAS USADAS

ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AG-II	Angiotensina II
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
CL	Cuerpo Lúteo
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GH	Hormona del Crecimiento
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
IGFBP	Proteínas Enlazadoras de los Factores Análogos a Insulina
IGF-I	Factor Análogo a Insulina tipo I
LH	Hormona Luteotrófica
NEFA	Ácidos Grasos no Esterificados
NPY	Neuropéptido Y
P4	Progesterona
PMSG	Gonadotropina del Suero de la Yegua Gestante
rbST	Somatotropina Bovina Recombinante

DEDICATORIA

El esfuerzo y dedicación puestos en mi trabajo están especialmente dedicados a ti....., gracias por estar siempre conmigo.

AGRADECIMIENTOS

La tesis de maestría titulada **“RESPUESTA SUPERESTIMULATORIA DE VAQUILLAS HOLSTEIN TRATADAS CON DOS DOSIS DE SOMATOTROPINA”** fue realizada gracias al apoyo académico y económico de:

Posgrado en Producción Animal de la Universidad Autónoma Chapingo

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología

Ph. D. Raymundo Rangel Santos

Ph. D. Raymundo Rodríguez de Lara

Ph. D. Carlos Gutiérrez Aguilar

Ph. D. Maximino Huerta Bravo

Ph. D. José Luis Zaragoza Ramírez

Dr. Alejandro Lara Bueno

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Juan González Maldonado
Fecha de nacimiento	2 de septiembre de 1986
Lugar de nacimiento	Santa Cruz de Juventino Rosas, Guanajuato, México
CURP	GOMJ860902HGTNLN07
Cédula profesional	6862770



Desarrollo académico

Profesión	Ingeniero Agrónomo Especialista en Sistemas Pecuarios de Zonas Áridas
Preparatoria	Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo
Licenciatura	Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, UACH

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La transferencia de embriones en bovinos es una industria bien establecida, con más de 500 mil embriones transferidos anualmente en el mundo. Actualmente, el uso de esta tecnología está enfocado hacia el mejoramiento genético animal. Uno de los principales beneficios que ofrece la transferencia de embriones es la producción de embriones *in vivo* libres de enfermedades, lo cual es de gran importancia para el intercambio internacional de material genético así como para los programas de control de enfermedades (Mapletoft, 2012). Sin embargo, a pesar de que actualmente se cuenta con técnicas y protocolos para desarrollar programas de transferencia de embriones, aún permanece un problema que es constante para cualquier especialista dedicado a la producción de embriones *in vivo*, éste es la variabilidad en la respuesta superestimatoria, lo cual se refiere a una incapacidad para normalizar la respuesta ovulatoria (número de cuerpos lúteos) así como la producción de embriones transferibles dentro y entre animales superestimulados (donadoras).

La somatotropina bovina recombinante (rbST) es una hormona que ha sido utilizada como complemento a los programas de producción de embriones, debido a su capacidad para estimular el reclutamiento y desarrollo folicular. Por tanto, en este documento se presenta una revisión del efecto de la rbST sobre la fisiología reproductiva y producción de embriones en bovinos. Además, se incluye un apartado sobre algunos de los factores que pueden afectar el resultado de un programa de superestimulación así como una descripción de la interacción entre medio ambiente (estrés calórico) y la fisiología reproductiva de la hembra.

La revisión sirvió como base para el desarrollo del trabajo de investigación que se anexa a este documento. Este trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la respuesta ovulatoria y producción de embriones en vaquillas Holstein después de ser tratadas con una o dos dosis de rbST.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Estrés calórico y reproducción animal

El estrés calórico puede ser definido como el conjunto de fuerzas inducidas por las altas temperaturas que desencadenan ajustes desde niveles sub-celulares hacia el resto del organismo para ayudar a la vaca a evitar disfunciones fisiológicas a causa de la hipertermia o para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales (Kadzere *et al.*, 2002). Para determinar si la vaca se encuentra en estrés calórico se ha usado el índice de temperatura-humedad (Thom, 1959; Dikmen y Hansen, 2009), donde valores de 70-78 indican condiciones estresantes y valores superiores a 78 indican extremo estrés (Kadzere *et al.*, 2002). También, se puede considerar que temperaturas por encima de la zona termoneutral de la vaca, 5 a 20 °C (NRC, 2001), le ocasionarán cierto grado de estrés calórico.

El estrés calórico es un problema creciente en la reproducción animal debido a dos factores principales, el primero es el incremento en la producción de leche por animal y el segundo es el incremento en la temperatura ambiental a causa del calentamiento global. Con respecto al primero, a nivel mundial se ha tenido una tendencia positiva en el incremento de producción de leche por animal (Oltenacu y Broom, 2010). En los Estados Unidos, de 1980 al 2000, el incremento fue del 34% (National Agricultural Statistics Service, 2011). Para este mismo periodo el intervalo entre partos se incrementó de <13 a >14.5 meses y el número de servicios por concepción se elevó de 2 a >3.5 en 143 hatos (Lucy, 2001). El comportamiento reproductivo también se ve afectado por la producción de leche. Lopez *et al.* (2004) reportaron una disminución en el periodo de celo de 5.6 horas en vacas altas productoras comparado con vacas de menor producción. En general, se tiene una correlación negativa entre

producción de leche y porcentaje de preñez (Spalding *et al.*, 1975; Butler, 2000).

El calentamiento global ha contribuido a incrementar el efecto del estrés calórico sobre la reproducción. Desde 1970 se ha tenido un incremento en la temperatura atmosférica de $\sim 0.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Allison *et al.*, 2009). De acuerdo con Peggy *et al.* (1998), el cambio climático puede ocasionar reducciones en los porcentajes de preñez, hasta en un 35%. En un estudio realizado por de Vries y Risco (2005), se observó que el porcentaje de preñez disminuyó de 21.6% de 1977-1979 a 12% en el 2000-2002, este último periodo coincide con la incidencia de alguno de los años más calurosos de la década (Hansen *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2010). A los bajos porcentajes de preñez debemos aún adicionarle las pérdidas fetales a causa del estrés calórico, estas pérdidas corresponden a un 10% para vacas lactantes y 4.7% para vaquillas (Jousan *et al.*, 2005). Además, es importante considerar que la capacidad de disipación de calor en vacas altas productoras se encuentra aún más limitada en los meses de verano, debido a la cantidad de calor metabólico generado, vacas con producción de 31 kg día^{-1} producen 48.5% más calor metabólico que una vaca seca (Purwanto *et al.*, 1990). Por tanto, incrementos en la temperatura corporal de las vacas altas productoras podrán ocurrir fácilmente durante los días con elevada temperatura. Lo cual puede comprometer su fertilidad, debido a que un incremento de $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la temperatura uterina, por arriba de $38.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, produce reducciones del 12.8% en el porcentaje de preñez (Gwazdauskas *et al.*, 1973). Existe una alta posibilidad de que continuamente ocurra lo anterior, ya que según Braton *et al.* (1953), la temperatura de la vaca se incrementa $1.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ cuando se tienen temperaturas ambientales de 32 a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 Ciclo estral y calidad del ovocito durante periodos de estrés calórico

El estrés calórico afecta a muchos de los componentes del eje reproductivo de la hembra, tales como: secreción de gonadotropinas, desarrollo folicular, función de las células de la teca y granulosa así como calidad del ovocito (Roth, 2008). Gilad *et al.* (1993) reportaron que el estrés crónico en vacas lecheras deprime la liberación tanto de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) como de la Hormona Luteotrófica (LH), al ser estas esenciales en el proceso de desarrollo folicular y ovulación (Mihm y Bleach, 2003), es probable que tal disminución en su secreción resulte en alteraciones en dichos procesos. Según Bandinga *et al.* (1993), vacas en estrés calórico presentaron alteraciones en el proceso de selección y dominancia folicular, manifestado por una reducción en el tamaño y cantidad de líquido en el folículo dominante así como por un aumento en el tamaño de folículos subordinados. Durante la segunda oleada folicular, el folículo dominante presenta un crecimiento más rápido en vacas bajo estrés calórico, para el día ocho y 10 su tamaño fue de 5 y 7 mm, mientras que en vacas control, para los mismos días, el tamaño fue de 3 y 4 mm, respectivamente. Además, hay proliferación de folículos grandes (≥ 10 mm), resultado de una depresión en el nivel de dominancia (Wolfenson *et al.*, 1995). Resultados de Roth *et al.* (2000) muestran que durante la segunda oleada folicular las concentraciones y amplitud del pico de FSH así como la duración de la oleada fueron mayores en vacas bajo estrés que en el grupo control; y que además esta segunda oleada emergió más tempranamente en los animales tratados. La aparición temprana de la segunda oleada así como su mayor duración pueden resultar en la producción de un ovocito viejo y de baja calidad.

Es posible que el estrés calórico ejerza su efecto a través de alteraciones en los grupos celulares del ovario. Shimizu *et al.* (2005) señalan que el estrés calórico reduce la expresión de receptores a FSH así como la actividad de la enzima aromatasa en células de la granulosa de folículos antrales y preovulatorios. Los

efectos deletéreos del estrés sobre la enzima aromatasa (Bandinga *et al.*, 1993) y 17 α -hidroxilasa (Rzenboim *et al.*, 2007) provocan a su vez una disminución en la capacidad esteroidogénica del folículo. Lo anterior, explica la baja concentración de estrógenos, debido a las alteraciones en la dominancia folicular, mencionada anteriormente. La disminución en la concentración de estrógenos provoca a su vez una reducción del 63% en la expresión de celos durante la época calurosa (Hussain *et al.*, 1992), lo cual podría explicar la disminución en los porcentajes de preñez, mencionados en la sección anterior.

El estrés calórico ejerce un efecto a largo plazo sobre la función ovárica de la vaca. De acuerdo con Roth *et al.* (2001), existe una disminución del 40% en la viabilidad de las células de la granulosa y una reducción del nivel de producción de androstenediona y estradiol en vacas previamente expuestas a condiciones de estrés calórico. También, se observa una disminución en la capacidad de dominancia folicular, al incrementarse el número de folículos de clase uno (3-5 mm) y tres (≥ 10 mm) (Guzeloglu *et al.*, 2001). En general, existe una disminución en la calidad del ovocito durante la temporada calurosa comparada con la de invierno (Rocha *et al.*, 1998). Al respecto, resultados de Al-katani *et al.* (2002a) muestran que durante los meses de estrés calórico solamente el 11.4% de los ovocitos colectados desarrollaron a blastocisto, comparado con 30% en los meses de invierno. La reducción en la calidad del ovocito se debe a alteraciones en el proceso de maduración nuclear, condensación de cromatina, reducción de la capacidad de fertilización (Roth y Hansen, 2005) e inducción de apoptosis a través de caspasa II (Roth y Hansen, 2004), lo cual conduce a una disminución de la capacidad del ovocito para soportar el desarrollo embrionario temprano después de la fertilización.

2.3 Secuelas del estrés calórico sobre la viabilidad del embrión

La producción de embriones en vacas superestimuladas puede ser afectada por la edad del animal, tratamiento y su ambiente (Mapletoft *et al.*, 2002). Este último, es de mayor importancia en bovinos Holstein, debido a la alta susceptibilidad de los embriones de esta raza al estrés calórico (Paula-Lopes *et al.*, 2003). El estrés calórico en vaquillas Holstein durante los días uno al siete posinseminación produjo un 79% de embriones anormales, con desarrollo retardado y degeneración de blastómeros (Putney *et al.*, 1988). Resultados similares, pero *in vitro*, han sido reportados por Sugiyama *et al.* (2003). Las anomalías causadas al embrión por efecto del estrés calórico incluyen: daños en micro túbulos, micro filamentos, desnaturalización de proteínas y cromatina (Rivera *et al.*, 2004), reacomodo de organelos, inflamación de mitocondria, vacuolización del citoplasma (Rivera *et al.*, 2003), reducción en el número celular (Jousan y Hansen, 2004) así como en la expresión del gen POU5F1 (Gendelman *et al.*, 2010), el cual es esencial en el mantenimiento de la totipotencia del embrión. Siendo el embrión más susceptible a este tipo de daño cuando se encuentra en la etapa de dos células (Ealy *et al.*, 1993).

El embrión de dos células es más sensible a los efectos del estrés calórico, pero a medida que se desarrolla adquiere capacidad de termotolerancia. El desarrollo de termotolerancia implica cambios bioquímicos que generalmente involucran a las proteínas de choque calórico (HSP70) o glutatión (Edwards y Hansen, 1997). Aun cuando en el embrión de dos células se ha reportado la capacidad de síntesis de proteínas de choque calórico (HSP68, HSC71 y HSC70) (Edwards *et al.*, 1997), éste no es capaz de contrarrestar los efectos del estrés calórico, probablemente, debido a que no las sintetiza en cantidades suficientes (Chandolia *et al.*, 1999b). Lo anterior, es confirmado por los resultados de Al-katani y Hansen (2002b), quienes después de someter embriones a un calor ligero por 80 minutos, para después ser expuestos a

temperaturas de 41 °C por 4.5 o 12 horas, no mostraron un desarrollo de termotolerancia. En el caso de glutatión, se ha reportado una disminución en los niveles de éste, por efecto de las altas temperaturas (Anderstam *et al.*, 1992), mientras que su adición al medio de cultivo ha mejorado la sobrevivencia embrionaria. Ealy *et al.* (1995) por su parte, no encontraron ningún efecto positivo al adicionar 50 nM de glutatión al medio de cultivo, dichas diferencias pudieron deberse a la concentración usada o bien al largo e intensidad del estrés calórico al cual fue sometido el embrión.

El desarrollo de termotolerancia va a depender de la duración, intensidad del estrés calórico y genotipo del ovocito. Cuando se sometió a embriones, producidos *in vitro*, a una temperatura de 41 °C, el porcentaje que desarrolló a una etapa de ≥ 16 células fue de 27%, mientras que cuando se aplicó la misma temperatura, pero por tres horas, solamente el 12% de los embriones continuó desarrollándose (Ealy *et al.*, 1995). En otro estudio, Arechiga *et al.* (1995) encontraron que mientras que solamente el 7% de los embriones expuestos a 43 °C sobrevivía al choque calórico, este porcentaje se incrementó al 74% cuando se usaron embriones previamente expuestos a un estrés calórico de 40 °C. En relación con el ovocito, estudios muestran que es éste quien aporta la capacidad de termotolerancia y no el espermatozoide (Chandolia *et al.*, 1999a; Block *et al.*, 2002), por lo que la selección de madres resistentes al calor sería una buena herramienta en el control del estrés calórico.

2.4 Implicaciones del estrés calórico y oxidativo en la muerte celular

La apoptosis embrionaria es un mecanismo controlado y gradual. De acuerdo con Lopes y Hansen (2002b), el desarrollo de la capacidad de inducir apoptosis en respuesta al estrés calórico en el embrión no ocurre hasta los cuatro días posinseminación (embriones de ocho a 16 células), a través de un incremento en la actividad de caspasa-9, causada por una despolarización de la

mitocondria, ocasionada por el mismo estrés calórico (Loureiro *et al.*, 2007). El control del proceso de apoptosis en etapas de 8 a 16 células puede ser considerado como una adaptación al estrés calórico, en embriones sometidos a estrés, solamente el 26% de los blastómeros fueron apoptóticos, esta proporción no compromete el desarrollo del embrión, pero sí asegura la remoción de células dañadas que pudieran comprometer su viabilidad (Lopes y Hansen, 2002a). Embriones de dos a cuatro células son incapaces de controlar el proceso apoptótico (Lopes y Hansen, 2002b). Brad *et al.* (2007) sugieren que ésto se debe a que la capacidad de activación de caspasa-9 se encuentra bloqueada, probablemente, debido a que la membrana de la mitocondria es resistente a la despolarización, o a que no exista una fragmentación del Ácido Desoxiribonucleico (ADN), a causa de la caspasa-3. Fear y Hansen (2011) proponen que esta incapacidad se debe a la mayor expresión de Ácido Ribonucleico mensajero (ARNm) para BCL-2 (proteínas antiapoptóticas) y menor expresión de ARNm de la proteína BAD (una proteína pro-apoptótica) en embriones de dos células, comparado con los de 16 células. Resulta interesante que la capacidad de controlar la apoptosis en embriones de 8 a 16 células coincide con la activación del genoma bovino (King *et al.*, 1988; Frei *et al.*, 1989), lo cual le permite una mayor capacidad de síntesis de proteína de choque calórico y/o mayor control sobre elementos involucrados en la generación de termotolerancia o apoptosis.

El estrés calórico puede estar también causando apoptosis de una forma indirecta, al modificar el ambiente del embrión. Ozawa *et al.* (2002) encontraron que elevadas temperaturas producen una pérdida embrionaria a causa de una alta concentración de peróxido de hidrógeno y a una disminución en la concentración de glutatión citosólico. La disminución en la concentración de glutatión también ha sido reportada por Anderstam *et al.* (1992) y Arechiga *et al.* (1995). Por su parte, la adición de glutatión al medio de cultivo mejora el desarrollo de embriones expuestos a estrés calórico (Edwards y Hansen, 1997). Embriones expuestos a estrés durante los días cero y dos después de la

fertilización mostraron un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Sakatani *et al.*, 2004), estos incrementos también han sido registrados en el oviducto por Ozawa *et al.* (2004) y Matsuzuka *et al.* (2005). El estrés calórico puede inducir apoptosis a través de la activación de la enzima esfingomielinasa, la cual hidroliza la membrana de fosfolípidos de la esfingomielina, para generar un segundo mensajero llamado ceramida (Haimovitz-Friedman *et al.*, 1997). Ceramida, es una molécula lipídica de señalización a base de esfingosina, que se encuentra regulando la apoptosis celular (Kolesnick y Krönke, 1998). La ceramida induce apoptosis en embriones de más de 16 células, al incrementar la actividad de caspasa-9, mientras que en embriones de dos células, reduce la proliferación celular y produce un incremento de células multinucleadas, debido a la inhibición de la citocinesis (de Castro e Paula y Hansen, 2008).

2.5 Superestimulación ovárica del ganado bovino

La superestimulación ovárica es el tratamiento que se aplica a diversas especies animales con el objetivo de obtener un número de ovulaciones, así como embriones, superior al que normalmente se obtiene durante un ciclo estral. Este tratamiento se lleva a cabo por motivos experimentales, conservación del material genético o para aumentar el número de descendencia de animales de alto valor genético, en peligro de extinción, resistentes a ciertas enfermedades o mejor adaptadas a determinados ambientes, a través de la transferencia de embriones. La superestimulación puede ser medida en términos del número de ovulaciones (cuerpos lúteos (CL)) o cantidad de embriones obtenidos. Sin embargo, el éxito de una superestimulación es dependiente de un gran número de factores, entre los que podemos mencionar: raza, edad del animal, estado nutricional, cantidad, tipo y pureza de la hormona utilizada, frecuencia y sitio de aplicación, estrés y población folicular. Por tanto,

antes de llevar a cabo un programa de superestimulación ovárica se deben de considerar estos factores.

La respuesta superestimuladora es diferente entre *Bos taurus* y *Bos indicus*. Tal diferencia reside en la fisiología reproductiva de ambas especies, la cual es discutida en la revisión de Busarelli *et al.* (2006), de acuerdo con estos autores, una de las principales diferencias radica en la población folicular, mientras que hembras *B. indicus* reclutan entre 33-39 folículos en cada onda folicular, las hembras *B. taurus* reclutan solamente de 21-25 (Alvarez *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2008). De acuerdo con Cushman *et al.* (1999) e Ireland *et al.* (2007), los animales con poblaciones foliculares altas presentan una concentración menor de FSH y responden mejor a tratamientos superestimuladores que aquellos con poblaciones foliculares bajas. Por el contrario, Abdalla y Thum (2004), Burns *et al.* (2005), Ireland *et al.* (2009) y Rico *et al.* (2011) reportan que los individuos con poblaciones foliculares bajas presentan concentraciones elevadas de FSH, las cuales se relacionan con una baja reserva de ovocitos así como un menor número de embriones disponibles para ser transferidos, requieren dosis mayores del tratamiento hormonal para la superestimulación y presentan una mayor expresión de genes para la hormona antimülleriana. Esta última hormona, producida por los folículos en crecimiento, tiene un efecto negativo sobre el reclutamiento de folículos primordiales e inhibe el efecto estimulador de FSH (ver revisión de Visser *et al.*, 2006) y sus concentraciones pueden ser utilizadas como un indicador de la respuesta superestimuladora en bovinos (Rico *et al.*, 2009). Las vacas superestimuladas y con concentraciones menores a 87 pg mL⁻¹ producirán menos de 15 folículos al estro (Rico *et al.*, 2012). Sin embargo, concentraciones reducidas de la hormona antimülleriana están también relacionadas con una disminución en la reserva de folículos por parte del ovario (ver revisión de Karkanaki *et al.*, 2011). En vacas adultas, el número de folículos primordiales permanece estable hasta los cuatro a seis años de edad, para comenzar a disminuir hasta casi cero a los 20 años (Erickson, 1966). Además, los animales adultos reclutan un menor número de folículos de entre

4-5 mm en cada oleada folicular y presentan una mayor concentración de FSH que animales jóvenes (Malhi *et al.*, 2005), lo cual explica la disminución de un 82% en el número de embriones transferibles en vacas de ≥ 14 años de edad, en comparación con hembras de dos a ocho años (Silva *et al.*, 2009). Entonces, las hembras que serán utilizadas en un programa de superestimulación deben ser animales jóvenes y con poblaciones foliculares altas, las cuales pueden ser determinadas mediante ultrasonografía (Derar *et al.*, 2012), se puede recurrir a la identificación de animales con respuesta superestimuladora baja a través de la hormona antimülleriana o se puede probar con algunos métodos utilizados en humanos, como la evaluación del polimorfismo del gen para el receptor a FSH (Gaber *et al.*, 2011) así como con otros descritos por Badawy *et al.* (2011).

El plano nutricional así como la alimentación del animal son dos factores críticos en los programas de superestimulación. Una alimentación deficiente o animales perdiendo peso pueden presentar una inhibición de la foliculogénesis así como alteraciones en la secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), FSH y LH (Scaramuzzi *et al.*, 2006), de igual forma, animales en condición corporal elevada (4-5), presentan una pobre o nula respuesta superestimuladora, caso contrario en animales con condición corporal moderada (3) (Siddiqui *et al.*, 2002). Es probable, que algunos de los factores involucrados correspondan a insulina y al Factor Análogo a Insulina tipo I (IGF-I), debido al comportamiento de estas hormonas cuando el animal está perdiendo o ganando peso (León *et al.*, 2004). La relevancia de ambas hormonas es revisada en apartados posteriores. Independientemente del estado nutricional, un gran número de investigaciones se han enfocado a la mejora de la respuesta superestimuladora a través de la suplementación. Sin embargo, de acuerdo con Velazquez (2011), la suplementación con vitaminas o ácidos grasos ofrecen resultados contradictorios, el incremento en el nivel de proteína no mejora la producción de embriones, mientras que la eficiencia de la suplementación mineral depende de si el animal presenta o no deficiencias. Por consiguiente, es aconsejable seleccionar a donadoras con condición corporal

moderada y si se decide llevar a cabo una suplementación, primero se deberá analizar si el animal necesita dicho suplemento, en qué cantidad y cuál es la forma y mejor momento para llevarla a cabo.

La Gonadotropina del Suero de la Yegua Gestante (PMSG) o gonadotropina coriónica equina junto con preparaciones de FSH, son las hormonas comúnmente utilizadas para la inducción de la superestimulación. Ambas hormonas han sido utilizadas en diferentes dosis, con el mismo resultado, dosis elevadas son contradictorias para la respuesta superestimuladora y/o viabilidad embrionaria (Bellows *et al.*, 1969; Gonzalez *et al.*, 1994; Kanitz *et al.*, 2002). Ésto puede deberse en parte a que el uso de gonadotropinas (FSH, LH o una combinación de ambas) en concentraciones elevadas puede ocasionar la activación prematura del ovocito, lo que ocasiona la ovulación de un ovocito viejo o anormal, teniendo la PMSG, en comparación con Folltropin (FSH), una mayor predisposición a que esto ocurra (Moor *et al.*, 1985). Además, dado que la PMSG tiene una vida media larga, de hasta 10 días (Menzer y Schams, 1979), es probable que algunos folículos continúen creciendo hasta el día de la colección de embriones. También, se sabe que las secreciones de estrógenos de dichos folículos tonifican el útero, lo que hace difícil su lavado (Booth *et al.*, 1975; Gonzalez *et al.*, 1994) y aun cuando el uso de antisuero contra PMSG ha generado buenos resultados (Katagiri *et al.*, 1991; Nakajima *et al.*, 1992), se ha hecho más común el uso de FSH purificada. La FSH puede ser aplicada en dosis decrecientes por un periodo de tres a cuatro días o en una sola ocasión, esta última ya sea vía intramuscular o subcutánea detrás del hombro, con resultados similares (Bo *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 2007). Sin embargo, aún persiste el problema de la alta variabilidad en la respuesta superestimuladora a los tratamientos.

Los intentos por mejorar la respuesta superestimuladora están basados en el uso de FSH en combinación con otras hormonas. Takahashi y Kanagawa

(1985) utilizaron la FSH en combinación con LH, al respecto Mapletoft *et al.* (2002) afirman que cierta cantidad de LH es necesaria para una superestimulación exitosa, pero es probable que las concentraciones endógenas sean suficientes, por lo que la concentración de LH en las preparaciones para superestimulación no debe superar el 20%. La inmunización contra inhibina en animales superestimulados ha resultado en un incremento del 78% en el número de cuerpos lúteos y de 65 a 180% más embriones transferibles (Takedomi *et al.*, 2005; Mei *et al.*, 2009), la sincronización de las oleadas foliculares a través de la aspiración del folículo dominante, el uso de progesterona (P4) y estradiol, y otros métodos revisados por Bó *et al.* (2008) con el objetivo de iniciar el tratamiento superestimulador al momento de la emergencia de una nueva oleada folicular, son aceptados como métodos para mejorar la respuesta superestimuladora. Otra alternativa que ha ofrecido resultados variables es la combinación de FSH con gonadotropina coriónica equina (Davis *et al.*, 2011; Mattos *et al.*, 2011) así como el uso de somatotropina bovina recombinante (Cuadro 1). Independientemente del protocolo de superestimulación usado, existe un factor que siempre estará presente en mayor o menor grado, el estrés, el cual puede ser resultado de la interacción del animal con su medio ambiente o de la interacción con el hombre (Bényei *et al.*, 2001; Macedo *et al.*, 2011), lo cual puede afectar la calidad del embrión.

2.6 Somatotropina y metabolismo

La aplicación de somatotropina bovina produce alteraciones en el metabolismo normal del animal. Su aplicación produce una reducción de las concentraciones plasmáticas de urea (34%), glucosa (33%) y calcio (Sallam *et al.*, 2005; Azza *et al.*, 2010; Chaiyabutr *et al.*, 2011). Además, se observa un incremento en las concentraciones de ácidos grasos no esterificados (NEFA) (Lucy *et al.* 1993), colesterol (De la Sota *et al.*, 1993) y fósforo (Azza *et al.*, 2010). La disminución

en la concentración de urea puede estar indicando una mayor remoción de aminoácidos del torrente sanguíneo para la biosíntesis de proteína, la retención de nitrógeno puede ser de hasta 10 g día^{-1} (Eisemann *et al.*, 1986b). También, se ha reportado que la somatotropina incrementa la pérdida de energía vía orina, heces y metano; así como el uso de energía de reserva. En animales que se encuentran en balance energético negativo al inicio del tratamiento con somatotropina, se agrava su estado negativo al incrementar la movilización de lípidos para usarlos como fuente de energía (Eisemann *et al.*, 1986a; Eisemann *et al.*, 1986b; Tyrrell *et al.*, 1988).

2.7 Somatotropina y fisiología animal bajo estrés calórico

La somatotropina incrementa la susceptibilidad de los animales a los efectos del estrés calórico (Settivari *et al.*, 2007), produce un incremento en la temperatura corporal (Jousan *et al.*, 2007) y tiende a incrementar la frecuencia respiratoria (Settivari *et al.*, 2007). De acuerdo con Elvinger *et al.* (1992), las diferencias en temperatura por acción de la somatotropina se observarán cuando la temperatura rectal promedio de los animales sea de al menos 40.5 °C . West *et al.* (1990) encontraron que la aplicación de 20 mg día^{-1} de somatotropina bajo condiciones de estrés calórico produjo un incremento de 0.2 y 0.3 °C en la temperatura corporal por la mañana y la tarde en vacas Holstein, mientras que en vacas Jersey el incremento fue de 0.5 y 0.6 °C . La frecuencia cardíaca y consumo de oxígeno también se incrementan por efecto de la aplicación de la rbST, de 78 a 84 latidos por minuto y de 5345 a 5562 L d^{-1} , respectivamente (Tyrrell *et al.*, 1988). La aplicación de somatotropina también está relacionada con un incremento en las concentraciones de NEFA (Settivari *et al.*, 2007) y triglicéridos (West *et al.*, 1991) así como con un detrimento en la concentración de urea (West *et al.*, 1991), aunque ésto también puede estar asociado con un menor consumo de alimento (Srikandakumar y Johnson, 2004).

Cuadro 1. Efecto de la aplicación de somatotropina sobre la producción de embriones.

Animales	Tratamiento	Resultado	Autor
Vacas lactando y no lactando	500 mg al momento de la inseminación en donadoras.	El número de ovocitos sin fertilizar se redujo y se incrementó el porcentaje de embriones transferibles (77.2 vs 56.4%). Se encontraron más blastocistos en las vacas tratadas con somatotropina.	Moreira <i>et al.</i> (2002)
Vacas lactantes	500 mg un día después del estro en receptoras.	El porcentaje de concepciones más alto, 56.1%, se obtuvo para vacas que no fueron tratadas con somatotropina, pero que el embrión provenía de una vaca tratada con rbST el día de la inseminación.	Moreira <i>et al.</i> (2002)
Vacas lactantes y no lactantes	Superovulaciones continuas, se aplicaron 500 mg 14 días ⁻¹ .	El número de embriones transferibles no fue afectado.	Hasler <i>et al.</i> (2003)
Búfalas	250 mg el día cuatro después de la inserción del dispositivo liberador de progesterona.	El número de cuerpos lúteos, folículos o número de embriones recuperados por lavado no fue afectado. Sin embargo, el número de embriones transferibles fue mayor en el grupo tratado con somatotropina (3 ± 1.0 vs 0.8 ± 0.3).	Songsasen <i>et al.</i> (1999)
Vaquillas	500 mg siete días antes de la aplicación de FSH.	El porcentaje de embriones transferibles se incrementó (74.6 vs 58.6%).	Kuehner <i>et al.</i> (1993)
Vaquillas	20 mg junto con cada inyección de FSH.	El número de embriones transferibles no fue afectado (8.3 ± 5.3 vs 7.2 ± 6.6). Además, el grupo tratado con somatotropina presentó la mayor respuesta superestimuladora.	Rieger <i>et al.</i> (1991)
Vaquillas	600 mg semana ⁻¹ en un programa de aspiración folicular.	El número de ovocitos colectados por sesión no fue afectado. Además, el porcentaje de ovocitos que desarrollaron a blastocistos fue de 22 y 25% para el grupo de somatotropina y control, respectivamente.	Bols <i>et al.</i> (1998)
Vaquillas	300 mg cinco días antes de la aplicación de PMSG.	La combinación de somatotropina y PMSG incrementó en un 48.6% el número de embriones recuperados por lavado, pero redujo el porcentaje de embriones transferibles en un 41.8% en comparación con el grupo que solo recibió PMSG.	Gong <i>et al.</i> (1993a)
Vacas lactando	640 mg cinco días antes de iniciar el tratamiento con PMSG.	El número de embriones obtenidos en el grupo que recibió somatotropina fue 1.7 veces mayor que en el control.	Herrier <i>et al.</i> (1994)
Vacas lactando	640 mg el día de la inseminación artificial.	El número de embriones obtenidos no fue afectado.	Herrier <i>et al.</i> (1994)

2.8 Progesterona y reproducción animal durante estrés calórico

En este apartado se comenta brevemente la interacción entre somatotropina y progesterona, para posteriormente dar a conocer algunos estudios sobre esta hormona y la producción de embriones y al final se describe el efecto del estrés calórico sobre la producción de progesterona.

El efecto de la aplicación de somatotropina bovina sobre la concentración de progesterona es contradictorio. Algunos investigadores reportan que la aplicación de la rbST no afecta la concentración plasmática de progesterona (De la Sota *et al.*, 1993; Lucy *et al.* 1993; Yoshimura *et al.* 1993; Kirby *et al.*, 1997; Bilby *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2010). Sin embargo, Hutchinson *et al.* (1988) y Ovesen *et al.* (1994) sugieren que tanto la Hormona del Crecimiento (GH) como IGF-I potencian su síntesis, a través de incrementar la actividad de la enzima aromatasa y al acelerar la diferenciación celular de las células de la granulosa a células luteínicas, inducida por FSH. Lo anterior, es confirmado por Lucy *et al.* (1994), quienes reportan que la aplicación de somatotropina mejora la calidad del cuerpo lúteo, al incrementar la producción de progesterona durante la fase lútea temprana (≤ 10 días) y hacia el final de la misma (días 15 al 21). De acuerdo con Zhou *et al.* (1991), la expresión de IGF-I disminuye a medida que se incrementa el desarrollo folicular y diferenciación de las células de la granulosa, mientras que sus receptores continúan elevados, lo que sugiere que el efecto de IGF-I en la diferenciación de la granulosa es debido a la hormona presente en la sangre y no a la producida localmente. En contraste con lo anterior, Einspanier *et al.* (1990) sugieren que en células lúteales de vaquillas, IGF-I realiza su función de manera autocrina/paracrina, debido a que sus concentraciones en este tejido se correlacionan con la expresión del ARNm para IGF-I. Además, reportan que sus valores en estas células alcanzan su máximo nivel entre los días 12-17 del ciclo, para disminuir drásticamente

después de la luteólisis. Por tanto, parece ser que el efecto de la somatotropina sobre la producción de progesterona es mediada a través de IGF-I.

La concentración de progesterona está correlacionada con algunas características reproductivas del animal. La concentración de progesterona puede ser utilizada como un índice para la selección de animales en base a la respuesta superestimuladora y número de embriones transferibles (Saumande *et al.*, 1985; Amiridis *et al.*, 2002). Al respecto, Samartzi *et al.* (1995) encontraron una correlación positiva entre la concentración de progesterona y el número de cuerpos lúteos ($r=0.61$), número de embriones ($r=0.43$) y número de embriones transferibles ($r=0.36$). Según Goto *et al.* (1987) y Herrler *et al.* (1990), vacas con valores de $<10.5 \text{ ng mL}^{-1}$ de progesterona en leche y $>3.0 \text{ ng mL}^{-1}$ en suero al inicio del periodo de superestimulación presentaron la mejor respuesta y hasta ocho embriones transferibles por donadora. Por otra parte, concentraciones de progesterona de $>1 \text{ ng mL}^{-1}$ en suero al día del celo han sido relacionadas con una reducción en la calidad de los embriones recuperados (Gradela *et al.*, 1996). Por el contrario, Gong *et al.* (1993a) encontraron una correlación negativa ($r= -0.69$) entre la concentración de progesterona y el porcentaje de embriones transferibles en vacas que recibieron somatotropina y una dosis alta de PMSG. De igual forma, Tamboura *et al.* (1985) reportaron que incrementos en la concentración de progesterona en leche a los dos días de iniciado el tratamiento superestimulador tienen una correlación negativa ($r= -0.66$) con el porcentaje de embriones transferibles. En consecuencia, es posible incrementar el número de embriones transferibles a través de la selección de donadoras con base a las concentraciones de progesterona tanto en leche como en suero sanguíneo.

El organismo puede producir progesterona en partes diferentes al cuerpo lúteo y su importancia es circunstancial. Progesterona es importante en el proceso de ovulación de algunas especies (Murdoch *et al.*, 1986; Brannstrom y Janson,

1989; Hibbert *et al.*, 1996), pero no en bovinos (Li *et al.*, 2007). Además, es innegable su importancia en el reconocimiento y mantenimiento de la gestación (Bazer *et al.*, 2008; Spencer *et al.*, 2008), siendo el cuerpo lúteo la fuente primaria de progesterona en la mayoría de las especies. Sin embargo, existe otra fuente importante de este esteroide, las glándulas suprarrenales (Fajer *et al.*, 1971). El estrés no puede incrementar la secreción de progesterona de los ovarios, pero sí lo hace de las glándulas suprarrenales, sin afectar el patrón de secreción de LH, a través de la Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH) (Asher *et al.*, 1989). En vacas, la aplicación de ACTH puede producir un incremento en la concentración de progesterona después de cinco minutos de su aplicación y durar hasta por 60 minutos (Gwazdauskas *et al.*, 1972). En ovejas, Thompson y Wagner (1974) demostraron que las adrenales contribuyen a la producción de progesterona hacia el final de la gestación. En venados, Plotka *et al.* (1983) publicaron que el estrés por manejo produjo un incremento en la producción de progesterona de las adrenales y mencionan que dicha producción de progesterona es de mayor importancia en venados, ya que probablemente protege al feto ante los efectos del cortisol liberado por acción del estrés, dado que estos animales no cuentan con producción de P4 por parte de la placenta, o es mínima, al menos hasta el día 156 de la gestación (Plotka *et al.*, 1982). Sin embargo, Goodwin *et al.* (1998) en su trabajo con venados, encontraron que periodos prolongados de estrés producen una reducción en la concentración de progesterona. Lo anterior, puede estar indicando que el efecto sobre la secreción de progesterona es dependiente de la intensidad y largo de acción del estrés calórico sobre el animal.

Las concentraciones anormales de progesterona en el animal perjudican su fertilidad. El estrés calórico produce un incremento en la secreción de ACTH (Koto *et al.*, 2004), manteniéndose concentraciones elevadas aún después de haber terminado el estresor térmico (Djordjević *et al.*, 2003). Considerando que la ACTH puede inducir un incremento en las concentraciones de P4 (Gwazdauskas *et al.*, 1972), es de esperarse que la concentración de esta

última se incrementa durante el periodo de estrés calórico. Sin embargo, este estresor puede reducir (Rosenberg *et al.*, 1977; Rosenberg, 1982; Ronchi *et al.*, 2001), incrementar (Abilay *et al.*, 1975; Vaught *et al.*, 1977; Sheikheldin *et al.*, 1988) o no causar efecto (Wilson *et al.*, 1998; Uribe-Velásquez *et al.*, 2001) sobre la concentración de progesterona. Entonces, si se reduce la concentración de progesterona, es probable que la fertilidad disminuya, al reducirse la calidad de los ovocitos producidos, ya que la P4 participa en el desarrollo y maduración del ovocito, a través de la activación de la ruta que conlleva al rompimiento de la vesícula germinal (Jesus y Ozon, 2004). Lo anterior, permitiría suponer que la suplementación con progesterona ayudaría a mejorar la fertilidad del hato en la época de calor. Sin embargo, Geisert *et al.* (1991) reportan que tal suplementación no incrementa las concentraciones de P4, pero reduce el número de embriones transferibles, los cuales presentan un desarrollo adelantado. Es probable que no se incremente la concentración de progesterona debido a una mayor tasa metabólica de los animales (Sangsritavong *et al.*, 2002), lo que provoca que haya un mayor flujo de sangre hacia el hígado y por tanto una degradación más rápida de la hormona (Vallet *et al.*, 2002) o que la capacidad de producción de progesterona por parte del cuerpo lúteo esté disminuida. Por otro lado, el adelanto en el desarrollo embrionario, pudo ser ocasionado por concentraciones anormales de progesterona, las cuales promovieron la expresión de genes en el endometrio que corresponden a fases más adelantadas de desarrollo embrionario (Clemente *et al.*, 2009; Forde *et al.*, 2009), lo que provoca que los embriones se desarrollen más rápidamente, probablemente, a través de un incremento en su tasa metabólica, lo que podría comprometer su viabilidad en etapas posteriores (Leese *et al.*, 2007). Entonces, se puede concluir que una concentración baja de progesterona durante los meses de estrés calórico compromete la vida embrionaria y que su suplementación no es efectiva en incrementar el número de embriones transferibles.

Las concentraciones elevadas de progesterona pueden estar implicadas en algunos cambios observados en el animal durante la fase de estrés calórico. De acuerdo con Maia *et al.* (2005), a temperaturas $>30^{\circ}\text{C}$, el 85% del calor corporal de la vaca es disipado a través de la piel y el resto por vía respiratoria, lo anterior es logrado a través de una redirección del flujo sanguíneo hacia la periferia del cuerpo y una reducción a órganos como el ovario, cérvix y oviducto (Roman-Ponce *et al.*, 1978; Dreiling *et al.*, 1991; Lublin y Wolfenson, 1996). Progesterona puede reducir el aporte sanguíneo al útero, posiblemente a través de incrementar la susceptibilidad del músculo liso a las catecolaminas (Caton *et al.*, 1974; Ford, 1982). Sin embargo, de acuerdo con Brown y Harrison (1984), la disminución en el flujo sanguíneo del útero durante las fases de estrés calórico no es controlado por progesterona ni por los receptores β - o α -adrenérgicos, sino por incrementos en la secreción de oxitocina, hormona antidiurética (Dreiling *et al.*, 1991) y/o prolactina (Low *et al.*, 2005). Otra posible función de la progesterona está ligada al potasio, la pérdida del cual a través de la orina y sudor se incrementa durante el estrés por calor (El-Nouty *et al.*, 1980). La pérdida de potasio intracelular es una señal predisponente a la apoptosis en folículos atrésicos, los cuales se caracterizan por un incremento en la síntesis de progesterona (Gross *et al.*, 2001), ésto es de esperarse ya que según Elkarib *et al.* (1983), la P4 promueve la reabsorción de potasio y por tanto disminuye su pérdida. Este incremento en la síntesis de progesterona para promover la retención de potasio puede ser un intento del folículo para contrarrestar la apoptosis o bien puede ser una señal detonante del proceso de muerte celular. Por tanto, las variaciones en las concentraciones de progesterona no son la condicionante principal, durante estrés calórico, en la afectación del flujo sanguíneo del animal y es posible que esté involucrada en el mecanismo de atresia folicular.

La prolactina es importante en el proceso de termorregulación del animal y puede influir en la síntesis de progesterona. La prolactina participa en la regulación de los niveles de potasio, cuya suplementación durante el verano

produce mejoras en la producción y consumo de alimento (Mallone *et al.*, 1985; Schneider *et al.*, 1986), y del balance electrolítico (ver la revisión de Alamer, 2011), principalmente a través de modificar el flujo sanguíneo, pero también a través de incrementar el consumo de agua (ver la revisión de Collier *et al.*, 1982) y reducir la excreción de potasio y sodio (Horrobin, 1980), ésto es de recalcarse ya que bajo condiciones de estrés la secreción de la aldosterona, encargada de regular lo anterior, se encuentra disminuida (El-Nouty *et al.*, 1980). Además, se ha reportado que la prolactina, al menos en estudios realizados en roedores (Jabbour y Kelly, 1997; Stocco, 2012), es importante en la regulación de la función y síntesis de progesterona por parte del cuerpo lúteo. Sin embargo, esto último no ha sido bien establecido en bovinos (Simmons y Hansel 1964; Thompson *et al.*, 2011), pero dado que la secreción de la prolactina se incrementa durante estrés calórico no podemos hacer a un lado un posible efecto de ésta sobre la función reproductiva de la hembra.

2.9 Insulina y reproducción del animal durante estrés calórico

El incremento en la concentración de insulina por efecto de la aplicación de somatotropina es controversial. Por un lado, Bilby *et al.* (2004) y Rivera *et al.* (2010) mencionan un efecto en la concentración de insulina al aplicar somatotropina, por el contrario otros afirman que no hay tal (Schams *et al.* 1990; De la Sota *et al.*, 1993; Azza *et al.*, 2010).

La insulina puede afectar el funcionamiento del eje reproductivo de la hembra. De acuerdo con la revisión de Pralong (2010), insulina puede promover la expresión y secreción de GnRH, el cual podría a su vez promover la liberación de las gonadotropinas, o bien ésta puede hacerlo directamente a nivel de la pituitaria (Adashi *et al.*, 1981; Tanaka *et al.*, 2000). Lo anterior, permite suponer que la insulina puede influir en el desarrollo del folículo, al incrementar la esteroidogénesis (Spicer y Stewart, 1996), a través de potenciar la acción de LH

(Greisen *et al.*, 2001) o al promover la expresión de sus receptores (Sekar *et al.*, 2000). Sin embargo, de acuerdo con Butler *et al.* (2004), al menos en la primera oleada folicular, el efecto de insulina sobre la esteroidogénesis parece estar mediado por un incremento de la actividad de la aromatasa y no a través de cambios en el patrón o concentración de LH. Sin embargo, tanto el desarrollo del folículo como del ovocito por efecto de la insulina es dependiente de la dosis (Chaves *et al.*, 2011), al reducirse la calidad del ovocito así como el diámetro del folículo en animales con hiperinsulinemia (Adamiak *et al.*, 2005). Así lo han demostrado Bhatia y Price (2001), al encontrar que las concentraciones elevadas de insulina provocan que la FSH reduzca la actividad de la aromatasa, y por tanto la producción de estradiol y el desarrollo del folículo. Además, parece ser que la insulina tiende a disminuir la producción de IGF-I por las células de la granulosa (Spicer y Chamberlain, 2000) en folículos grandes de vacas Angus, pero no en vacas Brahman (Simpson *et al.*, 1994). Considerando lo anterior, es posible concluir que el efecto de la insulina sobre el eje reproductivo de la hembra es dependiente de su concentración.

La insulina interactúa con otras hormonas en la regulación del funcionamiento del eje reproductivo. En el caso de animales, dado que la insulina puede promover la secreción de IGF-I del folículo (Edwards *et al.*, 1996), se puede especular que una disminución en su concentración conllevará a su vez a la reducción en las concentraciones de IGF-I, lo cual es de relevancia dado el efecto de estas dos hormonas sobre la actividad de la Angiotensina II (AG-II) (Stefanello *et al.*, 2006), la cual ha sido identificada como un elemento importante en el proceso de maduración del ovocito y ovulación en el bovino (Ferreira *et al.*, 2007; Barreta *et al.*, 2008). Otro posible factor que pudiera estar participando es la leptina, se dice que esta hormona producida por los adipocitos, tiene la capacidad de modular la función reproductiva, al funcionar como una señal que indica el estado nutricional del animal. Al respecto, Amstalden *et al.* (2003) demostraron que la leptina es capaz de inducir la secreción de LH de la pituitaria, pero no la de GnRH del hipotálamo, de vacas

en ayuno, pero no en vacas alimentadas de manera normal. En otro trabajo, en el que se aplicó leptina a animales alimentados *ad libitum* se disminuyó la secreción de GnRH y LH. Lo anterior, indica que el efecto de la hormona sobre la actividad reproductiva del animal es dependiente del estado nutricional de los mismos, siendo mayor su concentración a medida que se incrementa la condición corporal del animal. Los estudios *in vitro* de Spicer y Francisco (1997, 1998) suponen que a bajas concentraciones de leptina, animales con condición corporal baja-moderada, la función folicular está regulada tanto por las gonadotropinas como por insulina, pero a concentraciones mayores, animales gordos, la leptina inhibe la esteroidogénesis inducida por las gonadotropinas e insulina, ya que de no ser así existiría una sobre estimulación del ovario. Por tanto, el efecto de la insulina sobre la reproducción animal es también dependiente de la condición corporal del animal.

Las concentraciones de insulina están implicadas en algunas patologías reproductivas. Los quistes en ovarios de bovinos, se caracterizan por tener bajas concentraciones intrafoliculares tanto de insulina como de IGF-I (Braw-Tal *et al.*, 2009). Además, estos animales tienen una baja respuesta de insulina a glucosa (Opsomer *et al.*, 1999). Caso contrario en mujeres con síndrome poliquístico, donde la hiperinsulinemia así como las elevadas concentraciones de IGF-I son características de dicho padecimiento. En vacas en balance energético negativo (niveles reducidos de insulina, IGF-I, leptina, incremento en los de NEFA) hay una alta incidencia de quistes foliculares (Gossen *et al.*, 2006), en este caso el desarrollo del folículo quedaría sujeto únicamente a la acción de las gonadotropinas, las cuales se producirán en forma limitada debido a una incapacidad de producción de GnRH por parte del hipotálamo (Bergmann *et al.*, 1999). Además, el incremento en los niveles de NEFA causan un efecto degenerativo en las células de la granulosa, lo cual induce un incremento en las secreciones de estradiol (Vanholder *et al.*, 2005). Su incremento en conjunto con el desbalance hormonal podría ser el detonante del desarrollo de quistes en las primeras semanas posparto, ya que al no haber una correcta liberación de

GnRH del hipotálamo, no se generará un pico preovulatorio de LH, aun cuando exista el estímulo de los estrógenos. Otra alternativa, sería que la cantidad de P4 que se produce por efecto de la lipólisis (Hamudikuwanda *et al.*, 1996) estuviera inhibiendo el pico preovulatorio o que éste ocurra a destiempo. Por consiguiente, la restauración del desbalance hormonal de la vaca postparto puede ser una alternativa en el tratamiento de los quistes foliculares.

El desarrollo del embrión es en parte dependiente tanto de insulina como de IGF-I. El ARNm para insulina e IGF-I es encontrado en embriones bovinos de una célula hasta la etapa de blastocisto (Schultz *et al.*, 1992). Se especula que insulina e IGF-I son producidos por el tracto reproductivo materno y tienen un efecto paracrino en la preimplantación del embrión (Lighten *et al.*, 1997). Se sugiere que insulina mejora el desarrollo embrionario al disminuir la incidencia de apoptosis celular, estimular el consumo de glucosa y/o transporte de aminoácidos (Matsui *et al.*, 1995b; Herrler *et al.*, 1998; Byrne *et al.*, 2002) para promover la síntesis de proteína (Lewis *et al.*, 1992) tanto en la masa celular interna como en el trofoectodermo (Harvey y Kaye, 1991; Augustin *et al.*, 2003). Se dice que para la síntesis de proteína, tanto insulina como IGF-I actúan a través del mismo receptor, el de insulina. Por otra parte, el efecto mitogénico de insulina e IGF-I sobre las células de la masa interna se da a través de diferentes receptores, insulina a través de su propio receptor e IGF-I a través de algún otro receptor (Harvey y Kaye, 1992). Pero insulina no tiene un efecto aditivo con IGF-I (Matsui *et al.* 1995a). Por el contrario, tanto IGF-I como insulina a altas concentraciones pueden inducir la apoptosis del embrión, específicamente de la masa celular interna, a través de un mecanismo iniciado por la inhibición del receptor a IGF-I y que posteriormente involucra la acción de ceramidas y proteínas Bax, entre otros (Katagiri *et al.*, 1996; Chi *et al.*, 2000). En consecuencia, tanto la insulina como IGF-I promueven el desarrollo embrionario, pero su efecto es dependiente de su concentración.

La insulina y su interrelación con otras hormonas pueden regular el consumo y reproducción animal bajo condiciones de estrés calórico. El estrés calórico produce un incremento en la secreción de insulina (Itoh *et al.*, 1998) y una disminución en la producción de NEFA (Wheelock *et al.*, 2010). De acuerdo con estos últimos investigadores, el incremento en la producción de insulina puede ser una adaptación evolutiva de los animales para enfrentar al estrés calórico, ya que la oxidación de los ácidos grasos produce 13% más calor que la vía glucolítica (Baumgard y Rhoads, 2007). Lo anterior, es de interés ya que sustenta el porque las vacas con elevada condición corporal son más susceptibles a los efectos del estresor térmico (Cincovic *et al.*, 2011). El incremento en la secreción de insulina se ve favorecido a su vez por un aumento de la sensibilidad a esta hormona por parte del organismo (Morera *et al.*, 2012), lo cual se debe probablemente a un incremento en la producción de adiponectina (Soodini y Hamdy, 2004; Morera *et al.*, 2012). También, durante el estrés térmico se incrementan los niveles de ARNm para ghrelina (Song *et al.*, 2012), ésta funciona como una señal estimuladora del consumo de alimento y necesidad preferencial hacia ciertos alimentos, encontrándose valores elevados en el ayuno, que disminuyen después de la comida, siendo uno de sus reguladores la insulina (Klok *et al.*, 2007; Skibicka *et al.*, 2011). Lo anterior, es de esperarse ya que al reducirse el consumo de alimento por efecto del estrés, el periodo de ayuno se incrementa y por tanto la secreción de Ghrelina; en vacas, las concentraciones de ésta decrecen una hora después de haber ingerido alimento (Hayashida *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha reportado que la Ghrelina afecta negativamente el comportamiento reproductivo del animal a través de inhibir la secreción de las gonadotropinas, reducción de la esteroidogénesis y perjudicando el desarrollo del ovocito. Lo anterior, lo puede hacer indirectamente a través del neuropéptido Y (NPY) y/o neuronas kiss o directamente a través de su receptor a nivel del ovario (Dupont *et al.*, 2010; Repaci *et al.*, 2011). Por consiguiente, insulina es sólo un elemento involucrado en los mecanismos utilizados por el organismo animal durante el estrés

calórico, entonces el entendimiento del mecanismo completo requiere del conocimiento de los demás componentes así como de sus interacciones.

La insulina, Ghrelina y leptina participan en la regulación del consumo de alimento. La insulina se encuentra en animales, bajo estrés calórico, en concentraciones por arriba de las normales, además esta hormona inhibe la secreción de Ghrelina. Sin embargo, la secreción de esta última se encuentra también aumentada por efecto del estrés, entonces ¿por qué se reduce el consumo de alimento en condiciones de estrés calórico, si la hormona que lo promueve se encuentra en concentraciones elevadas?, si se considera que durante estrés calórico los requerimientos de energía de mantenimiento se incrementan en un 7-25% (NRC, 2001), además de que existe una secreción de cortisol y movilización de lípidos; pudiendo estos últimos dos incrementar las concentraciones de leptina, ésto podría resultar en la generación de una señal de saciedad antes de lo requerido, y que por otro lado, el sistema del animal reconoce que no se ha consumido aún la cantidad de energía necesaria y le ordene comer más a través de incrementar la secreción de Ghrelina. Lo anterior, implicaría que la leptina ejerce un efecto mucho más potente que la Ghrelina en el control de la alimentación durante condiciones de estrés calórico.

2.10 Factor análogo a insulina tipo I y reproducción del animal

La aplicación de somatotropina incrementa la población de folículos de >6 mm. Resultados similares han sido reportados por Buratini *et al.* (2000). De acuerdo con Spicer y Stewart (1996), la somatotropina puede inhibir la producción de estradiol por las células de la granulosa, lo que estaría limitando su crecimiento así como la expresión del celo (Rivera *et al.*, 2010). Erdman *et al.* (1990) y Cecim *et al.* (1995) señalan que el efecto de GH sobre el comportamiento reproductivo es dependiente de la dosis (cantidad y frecuencia) utilizada, pudiendo suprimir la incidencia del celo a dosis altas, pero aquellos animales

que logran presentar celo aun con dosis elevadas de GH presentan tasas ovulatorias mayores. Lo anterior, ha sido previamente reportado por Kirkwood *et al.* (1988) y Kirkwood *et al.* (1989), al aplicar hormona del crecimiento durante el periodo de reclutamiento folicular. Entonces, el efecto de la somatotropina sobre la población folicular es dependiente de la dosis, frecuencia de aplicación y grado de sensibilidad del animal hacia la hormona.

El efecto de la somatotropina sobre la población folicular es mediado a través de IGF-I. El incremento en la población de folículos pequeños puede ser adjudicado al efecto antiapoptótico de la rbST (Danilovich *et al.*, 2000), a través del incremento en las concentraciones de IGF-I (Gong *et al.*, 1997), observándose un efecto positivo en la población folicular a las 72 horas de su aplicación (Gong *et al.*, 1993b). Sin embargo, algunos autores (Menashe *et al.*, 1991; Dor *et al.*, 1992; Ozawa *et al.*, 1996) sugieren que tanto GH como IGF-I no son esenciales para el desarrollo folicular, pero potencian la acción de FSH sobre éstos. Además, son requeridos para lograr patrones de desarrollo ovárico normales (Chase *et al.*, 1998). Contrario a los anteriores investigadores, Erickson *et al.* (1989) proponen a IGF-I como un agente modulador en la producción de estradiol, al ser más efectivo que FSH. Para tratar de dilucidar lo anterior, se retoman los trabajos de Kuehner *et al.* (1993) y Monniaux *et al.* (1997). Los autores postulan que folículos dominantes, en rumiantes domésticos, presentan un detrimento en las concentraciones intrafoliculares de Proteínas Enlazadoras de los Factores Análogos a Insulina (IGFBP) -2,-4 y -5, estas proteínas modulan la biodisponibilidad de IGF-I, debido a un detrimento en su síntesis por parte de las células foliculares y a un incremento en su degradación por proteasas intrafoliculares específicas. Como resultado, la biodisponibilidad de IGF-I se incrementa, amplificando la acción de las gonadotropinas sobre las células foliculares, caso contrario en eventos de atresia folicular. Entonces, la acción de la IGF-I sobre los folículos es a su vez mediada por sus proteínas enlazadoras.

¿Lo anterior implicaría que al incrementar las concentraciones de IGF-I a través de la aplicación de somatotropina se incrementará el número de folículos reclutados así como su tamaño? Con base a la información del Cuadro 2, se puede decir que efectivamente se obtendrá un mayor número de folículos reclutados. Sin embargo, es poco probable que IGF-I por sí mismo sea capaz de promover un desarrollo mayor de los folículos. Si bien es cierto, el ARNm, para el receptor a IGF-I es expresado desde fases foliculares tan tempranas como la preantral (Armstrong *et al.* 2000), al parecer esta hormona no es necesaria en esta etapa del desarrollo folicular, ya que según Thomas *et al.* (2007) las concentraciones elevadas de IGF-I producen un incremento en el número de ovocitos degenerados. Además, parece ser que el organismo tratará de autorregularse cuando se detectan cantidades elevadas de GH, ya que según Sirotkin y Makarevich (1999), al incrementarse las concentraciones de GH se reducen las de IGF-I y estradiol, este último implicado como otro factor de sobrevivencia folicular (ver revisión de Quirk *et al.*, 2004). También, se observa un incremento en la secreción de oxitocina (Sirotkin y Nitray, 1994), la cual es capaz de reducir la secreción de androstenediona por las células de la teca (Jo y Fortune, 2002). Otro efecto negativo, es la disminución en la expresión de receptores a LH (Jia *et al.*, 1986), lo cual comprometería el desarrollo de folículos de >4 mm, ya que estos son dependientes de gonadotropinas para su desarrollo (Awotwi *et al.*, 1984). Además, la función ovárica es controlada por un complejo sistema local de mecanismos de retroalimentación que asegura que en >96% de los ciclos estrales sólo un folículo pueda ovular (Webb *et al.*, 1994). Entre estos mecanismos se pueden mencionar a los que implican al ligando kit y al factor de desarrollo del fibroblasto (para más detalle ver Skinner, 2005). Por tanto, la acción de IGF-I sobre la salud del folículo es dependiente de su concentración y tiempo de acción.

La IGF-I es importante en el periodo preovulatorio. La somatotropina no afecta el tamaño del folículo preovulatorio (Kölle *et al.*, 2001), pero sí se observa un

incremento en el diámetro del segundo folículo más grande (Lucy *et al.*, 1993). De acuerdo con De la Sota *et al.* (1993), vacas recibiendo somatotropina pueden tener folículos dominantes que son menos capaces de controlar el desarrollo y función de folículos más pequeños. Lo anterior, es más bien un efecto del incremento en las concentraciones de IGF-I, como resultado de la aplicación de la somatotropina (Settivari *et al.*, 2007), de acuerdo con Echternkamp *et al.* (1990), las concentraciones de IGF-I en vacas con historial de partos gemelares presentan 47% más concentración de IGF-I en suero que vacas monotecas y un mayor número de folículos de mayor tamaño y con mayor concentración de la misma. Este crecimiento folicular podría estar explicado en parte por una mayor expresión de receptores a LH por acción de la IGF-I (Kirkwood *et al.*, 1990; Magoffin y Weitsman, 1994), lo que resulta en una mayor producción de androstenediona por parte de las células de la teca (Findlay 1993; Welt *et al.*, 2002; Jamnongjit y Hammes 2006), la cual puede ser utilizada como sustrato para la síntesis de estradiol por la enzima aromatasa (Jamnongjit y Hammes, 2006). Dicha expresión y viabilidad se incrementan por acción de IGF-I (Paul *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010), resultando en una mayor producción de estradiol y por tanto en un mayor desarrollo folicular (Fortune y Quirk, 1988). De acuerdo con estudios *in vitro* de Yoshimura *et al.* (1993), la somatotropina produce un incremento del diámetro folicular a las 12 horas de perfusión, incrementó la producción de estradiol de una manera dependiente de la dosis, pero no tuvo efecto sobre la ovulación. Sin embargo, el folículo preovulatorio presenta una mayor velocidad de crecimiento, probablemente resultado de una mayor pulsatilidad de LH (Lucy *et al.*, 1993), pero la amplitud y las concentraciones de esta hormona son menores en las vacas tratadas con somatotropina (Schemm *et al.*, 1990). Somatotropina a dosis fisiológicas puede estimular o inhibir la producción de androstenediona por las células de la teca, en los folículos grandes, dependiendo de si las células de la teca de estos folículos son responsivas a LH o no (Spicer y Stewart, 1996). Por consiguiente, el efecto de la IGF-I sobre el desarrollo folicular es resultado de su interacción con otros componentes del eje reproductivo.

La somatotropina puede o no afectar algunos de los componentes del eje reproductivo a través de IGF-I. La hormona del crecimiento amplifica la acción de las gonadotropinas en el proceso de desarrollo folicular y ovulación, al menos en parte por la estimulación de la producción ovárica de IGF-I (Ovesen, 1998; Volpe *et al.*, 1992; Homburg *et al.*, 1990; Blumenfeld *et al.*, 1994; Yoshimura *et al.*, 1994). Además, la aplicación de somatotropina el día de inicio del programa de sincronización mejora la maduración del ovocito a la metafase II (Pavlok *et al.* 1996). En un estudio realizado por Izadyar *et al.* (1997b) se reportó que las células de la granulosa mural, cumulus y del ovocito expresaban receptores a GH, ellos concluyen que el efecto estimulador de GH sobre la maduración del ovocito bovino es dependiente de las células del cumulus y no es mediado por IGF-1. Este efecto podría a su vez ser mediado por AMPc/PKA (Sirotkin y Makarevich, 1999), probablemente a través de un mecanismo asociado a proteínas G (Izadyar *et al.*, 1997a; Sirotkin *et al.*, 2002). Esta misma ruta es la utilizada para ejercer un efecto antiapoptótico (Sirotkin y Makarevich. 2002) así como para estimular la secreción de IGF-I en las células de la granulosa (Makarevich y Sirotkin, 2000). Otras posibles rutas de acción de la GH incluyen tirosina-, MAP y CDC2-kinasa (Sirotkin, 2005). Por tanto, la acción de la somatotropina en la reproducción animal es tanto directa como indirecta.

La somatotropina puede o no ejercer un efecto positivo sobre la producción de embriones (Cuadro 1). La aplicación de somatotropina incrementa la concentración de IGF-I (Kirby *et al.*, 1997) en un 51 (De la Sota *et al.*, 1993) a 122% (Settivari *et al.*, 2007). El IGF-I incrementa la proporción de embriones que desarrollan a la etapa de blastocisto (Byrne *et al.*, 2002) y acorta el tiempo entre la etapa de mórula a blastocisto (Palma *et al.*, 1997). Lo anterior, puede ser debido a su efecto antiapoptótico y mitógeno sobre las células del trofoectodermo (Prelle *et al.*, 2001; Makarevich y Markkula, 2002). En embriones producidos *in vitro* se detectó la presencia de ARNm para el receptor a GH desde los dos días de vida y alcanza su valor más alto a los siete días (Pantaleon *et al.* 1997; Kölle *et al.*, 2001), pero no es encontrado en el ovocito o

en la etapa de dos células (Terada *et al.*, 1996). Sin embargo, aun cuando se encuentre ARNm desde etapas tempranas, éste no es funcional sino hasta el día seis de vida embrionaria (Kölle *et al.*, 2001). De acuerdo con Drakakis *et al.* (1995), la hormona del crecimiento tiene un efecto positivo sobre el desarrollo del embrión hasta la etapa de blastocisto y eclosión (Izadyar *et al.*, 2000). Lo anterior, podría ser explicado por el incremento en la competencia del ovocito (Izadyar *et al.*, 1998), la aceleración en la maduración nuclear (Izadyar *et al.*, 1996), incremento en la disponibilidad de energía, al estimular el transporte de glucosa (Pantaleon *et al.*, 1997) y reducción de la apoptosis (Kidson *et al.*, 2004), al reducir la síntesis de las proteínas bax (Kölle *et al.*, 2002) y/o inhibición de la síntesis de prostaglandinas $F_{2\alpha}$ (Makarevich y Sirotkin. 1997). Además, a partir del día seis puede estimular la movilización de lípidos para ser usados como fuente de energía (Kölle *et al.*, 2001). Aun cuando la somatotropina desempeñe una función determinante en el desarrollo del embrión, parece ser que su efecto es dependiente del estado de desarrollo de éste.

Cuadro 2. Efecto de la aplicación de somatotropina sobre la dinámica folicular.

Animales	Tratamiento	Resultado	Autor
Vacas lactantes	Seis aplicaciones de 500 mg 10 días ⁻¹ a partir del día 61 ± 3 postparto.	La expresión del estro se redujo. El diámetro del folículo preovulatorio o diámetro del cuerpo lúteo no fue afectado. La incidencia de ovulaciones dobles no fue incrementada.	Rivera <i>et al.</i> (2010)
Vacas no lactantes	500 mg al día 0 y 11 del ciclo estral.	El número de folículos clase tres (≥10 mm) o el tamaño del folículo más grande no fueron afectados. El tamaño del feto y la producción de interferón tau se incrementaron.	Bilby <i>et al.</i> (2004)
Vacas primíparas	500 mg 14 días ⁻¹ . Siete inyecciones en total.	La aparición de la segunda oleada folicular ocurre 48 horas antes. La incidencia de folículos clase I (3 a 5 mm) y clase II (6 a 9 mm) fue incrementada. El diámetro del folículo dominante no fue afectado.	Kirby <i>et al.</i> (1997)
Vacas lactantes y no lactantes	25 mg día ⁻¹ durante un periodo de 19 días.	En vacas lecheras durante la primera oleada folicular se observó un incremento del 53% en el número de folículos clase II (6 a 9mm). El diámetro del segundo folículo más grande se incremento. El folículo dominante presentó una mayor tasa de crecimiento. El porcentaje de ovulaciones múltiples se incremento en vacas lactantes, pero no en las no lactantes.	De la Sota <i>et al.</i> (1993)
Vacas lactantes	25 mg día ⁻¹ durante un periodo de 19 días	El diámetro del folículo preovulatorio no fue afectado.	Lucy <i>et al.</i> (1993)
Búfalas de entre 20 y 30 meses de edad	500 mg y 12 días después dos aplicaciones a intervalos de 14 días	La población de folículos pequeños (<5 mm) fue aumentada, pero no hubo diferencias en la población de folículos medianos (5-10 mm), tampoco se encontraron diferencias en los folículos grandes (>10 mm). No se encontraron diferencias en la cantidad de ovocitos recuperados, pero se incrementó la cantidad de ovocitos de buena calidad por efecto de la aplicación de rbST.	Sá Filho <i>et al.</i> (2009)

Cuadro 3. Efecto de la aplicación de somatotropina sobre la fertilidad.

Animales	Tratamiento	Resultado	Autor
Vacas lactantes	500 mg 14 días ⁻¹ a partir de los 37 días postparto hasta aproximadamente los 72 días postparto.	El tiempo de retorno a celo en vacas no gestantes se redujo.	Santos <i>et al.</i> (2004)
Vacas no lactantes	500 mg al día 0 y 11 del ciclo estral.	El porcentaje de gestaciones se redujo en 36.4%.	Bilby <i>et al.</i> (2004)
Vaquillas	26 mg día ⁻¹ .	Los días a primer servicio se incrementaron en un 28%.	Burton <i>et al.</i> (1990)
Vaquillas	41.2 mg día ⁻¹ 5 ⁻¹ meses.	El porcentaje de concepciones o el número de servicios por concepción no fueron afectados.	Grings <i>et al.</i> (1990)
Vaquillas ovariectomizadas	Una aplicación de 500 mg 14 días ⁻¹ .	Los animales tratados tienden a reducir la duración del estro, montas dadas y recibidas.	Lefebvre y Block (1992)
Vacas lactantes	500 mg 14 días ⁻¹ a partir del día 60 postparto	El porcentaje de gestaciones a los 180 días se redujo en un 16.9%.	Luna-Dominguez <i>et al.</i> (2000)
Vacas	500 mg 14 días ⁻¹ de la semana 9 a la 29 postparto	La eficiencia reproductiva no fue afectada.	Schams <i>et al.</i> (1990)
Vacas multíparas	Multíparas: 500 mg 14 días ⁻¹ a partir de los 60 días postparto por 5 meses. Primíparas: 250 mg 14 días ⁻¹ a partir de los 60 días postparto por 5 meses.	El porcentaje de gestaciones, en ambos grupos, que recibieron 500 mg, se incremento en un 30%. Sin embargo, hubo un incremento en los días abiertos, en vacas multíparas fue de aproximadamente 60 días.	Azza <i>et al.</i> (2010)
Vacas repetidoras	500 mg al día del estro y 500 mg 10 días después.	El porcentaje de gestaciones se incremento (29.3 vs 16.9%).	Morales-Roura <i>et al.</i> (2001)

2.11 Literatura citada

- Abdalla, H., and M. Y. Thum. 2004. An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Human Reproduction* 19 (4): 893-898.
- Abilay, T. A., H. D. Johnson, and M. Madan. 1975. Influence of environmental heat on peripheral plasma progesterone and cortisol during the bovine estrous cycle. *Journal of Dairy Science* 58 (12): 1836-1840.
- Adamiak, S. J., K. Mackie, R. G. Watt, R. Webb, and K. D. Sinclair. 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biology of Reproduction* 73 (5): 918-926.
- Adashi, E. Y., A. J. Hsueh, and S. S. Yen. 1981. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology* 108 (4): 1441-1449.
- Alamer, M. 2011. The role of prolactin in thermoregulation and water balance during heat stress in domestic ruminants. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6 (12): 1153-1169.
- Al-katani, Y. M., F. F. Paula-Lopes, and P. J. Hansen. 2002a. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 85 (2): 390-396.
- Al-katani, Y. M., and P. J. Hansen. 2002b. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of the heat shock protein 70 in embryonic development. *Molecular Reproduction and Development* 62 (2): 174-180.
- Allison, I., N. L. Bindoff, R. A. Bindschadler, P. M. Cox, N. de Noblet, M. H. England, J. E. Francis, N. Gruber, A. M. Haywood, D. J. Karoly, G. Kaser, C. Le Quéré, T. M. Lenton, M. E. Mann, B. I. McNeil, A. J. Pitman, S. Rahmstorf, E. Rignot, H. J. Schellnhuber, S. H. Schneider, S. C. Sherwood, R. C. J. Somerville, K. Steffen, E. J. Steig, M. Visbeck, A., and A. J. Weaver. 2009. *The Copenhagen Diagnosis: Updating the World on the Latest Climate Science*. The University of New South Wales Climate Change Research Centre (CCRC), Sydney, Australia, 60 p.
- Alvarez, P., L. J. Spicer, C. C. Chase Jr., M. E. Payton, T. D. Hamilton, R. E. Stewart, A. C. Hammond, T. A. Olson, and R. P. Wettemann. 2000. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal of Animal Science* 78 (5): 1291-1302.

- Amiridis, G. S., C. A. Rekkas, G. C. Fthenakis, E. Vainas, A. Lymberopoulos, V. Christodoulou, and S. Belibasaki. 2002. Progesterone concentration as an indicator of ovarian response to superovulation in Chios ewes. *Theriogenology* 57 (3): 1143-1150.
- Amstalden, M., D. A. Zieba, J. F. Edwards, P. G. Harms, T. H. Welsh Jr., R. L. Stanko, and G. L. Williams. 2003. Leptin acts at the bovine adenohypophysis to enhance basal and gonadotropin-releasing hormone-mediated release of luteinizing hormone: differential effects are dependent upon nutritional history. *Biology of Reproduction* 69 (5): 1539-1544.
- Anderstam, B., C. Vaca, and M. Harms-Ringdahl. 1992. Lipid peroxide levels in murine adenocarcinoma exposed to hyperthermia: the role of glutathione depletion. *Radiation Research* 132 (3): 296-300.
- Arechiga, C. F., A. D. Ealy, and P. J. Hansen. 1995. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. *Biology of Reproduction* 52 (5): 1296-1301.
- Armstrong, D. G., C. G. Gutierrez, G. Baxter, A. L. Glazyrin, G. E. Mann, K. J. Woad, C. O. Hogg, and R. Webb. 2000. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology* 165 (1): 101-113.
- Asher, G. W., A. J. Peterson, and D. Duganzich. 1989. Adrenal and ovarian sources of progesterone secretion in young female fallow deer, *Dama dama*. *Journal of Reproduction and Fertility* 85 (2): 667-675.
- 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 (1): 91-99.
- Awotwi, E. K., D. S. Keeney, D. L. Hard, and L. L. Anderson. 1984. Effects of pulsatile infusion of luteinizing hormone-releasing hormone on luteinizing hormone secretion and ovarian function in hypophysial stalk-transected beef heifers. *Biology of Reproduction* 31 (5): 989-999.
- Azza, H. A., A. S. Khalil, H. T. EL-Hamamsy, and O. H. Ezzo. 2010. The effect of recombinant bovine somatotropin administration on milk production, some hemato-biochemical parameters and reproductive performance of lactating cows. *Global Veterinaria* 4 (4): 366-373.
- Badawy, A., A. Wageah, M. El Gharib, and E. E. Osman. 2011. Prediction and diagnosis of poor ovarian response: the dilemma. *Journal of Reproduction and Infertility* 12 (4): 241-248.
- Bandinga, L., W. W. Thatcher, T. Diaz, M. Drost, and D. Wolfenson. 1993. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology* 39 (4): 797-810.

- Barreta, M. H., J. F. Oliveira, R. Ferreira, A. Q. Antoniazzi, B. G. Gasperin, L. R. Sandri, and P. B. Goncalves. 2008. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2alpha. *Reproduction* 136 (6): 733-740.
- Baumgard, L. H., and R. P. Rhoads. 2007. The effects of hyperthermia on nutrient partitioning. *Proceedings of the Cornell Nutrition Conference* 93-104.
- Bhatia, B., and C. A. Price. 2001. Insulin alters the effects of follicle stimulating hormone on aromatase in bovine granulosa cells in vitro. *Steroids* 66 (6): 511-519.
- Bazer, F. W., R. C. Burghardt, G. A. Johnson, T. E. Spencer, and G. Wu. 2008. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reproductive Biology* 8 (3): 179-211.
- Bényei, B., A. Gáspárdy, and C. W. Barros. 2001. Changes in embryo production results and ovarian recrudescence during the acclimatisation to the semiarid tropics of embryo donor Holstein-Friesian cows raised in a temperate climate. *Animal Reproduction Science* 68 (1-2): 57-68.
- Bellows, R. A., D. C. Anderson, and R. E. Short. 1969. Dose-response relationships in synchronized beef heifers treated with follicle stimulating hormone. *Journal of Animal Science* 28 (5): 638-644.
- Bergmann, J., W. Heuwieser, B. Fischer, and A. Brückmann. 1999. Reaction of the pituitary gland to a single GnRH administration in the dependence of energy balance in cattle in the puerperium. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 27 (3): 154-160.
- 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 insulin-like growth factor system responses. *Journal of Dairy Science* 87 (10): 3256-3267.
- Blumenfeld, Z., M. Dirnfeld, Y. Gonen, and H. Abramovici. 1994. Ovulation induction may enhance conception in the co-treatment and succeeding cycles, in clonidine negative but not clonidine positive patients. *Human Reproduction* 9 (2): 209-213.
- Block, J., C. C. Chaser Jr., and P. J. Hansen. 2002. Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal versus paternal contribution. *Molecular Reproduction and Development* 63 (1): 32-37.
- Bols, P. E. J., M. T. Ysebaert, A. Lein, M. Coryn, A. Van Soom, and A. de Kruif. 1998. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an opu-ivf program. *Theriogenology* 49 (5): 983-995.

- Bó, G. A., D. C. Guerrero, and G. P. Adams. 2008. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology* 69 (1): 81-87.
- Bo, G. A., D. K. Hockley, L. F. Nasser, and R. J. Mapletoft. 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology* 42 (6): 963-975.
- Booth, W. D., R. Newcomb, H. Strange, L. E. Rowson, and H. B. Sacher. 1975. Plasma oestrogen and progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cow. *The Veterinary Record* 97 (19): 366-369.
- Brad, A. B., K. E. Hendricks, and P. J. Hansen. 2007. The block to apoptosis in bovine two-cell embryos involves inhibition of caspase-9 activation and caspase-mediated DNA damage. *Reproduction* 134 (6): 789-797.
- Brannstrom, M., and P. O. Janson. 1989. Progesterone is a mediator in the ovulatory process of the in vitro-perfused rat ovary. *Biology of Reproduction* 40 (6): 1170-1178.
- Braton, C., J. E. Johnston, and G. D. Miller. 1953. Physiological and hereditary responses of lactating Holstein-Friesian and Jersey cows to natural environmental temperature and humidity. *Journal of Dairy Science* 36: 585 (Abstract).
- Braw-Tal, R., S. Pen, and Z. Roth. 2009. Ovarian cysts in high-yielding dairy cows. *Theriogenology* 72 (5): 690-698.
- Brown, D. E., and P. C. Harrison. 1984. Lack of peripheral sympathetic control of uterine blood flow during acute heat stress. *Journal of Animal Science* 59 (1): 182-188.
- Buratini, J. Jr., C. A. Price, J. A. Visintin, and G. A. Bó. 2000. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology* 54 (3): 421-431.
- Burns, D. S., F. Jimenez-Krassel, J. L. H. Ireland, P. G. Knight, and J. J. Ireland. 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction* 73 (1): 54-62.
- Burton, J. L., B. W. McBridem J. H. Burton, and R. G. Eggert. 1990. Health and reproductive performance of dairy cows treated for up to two consecutive lactations with bovine somatotropin. *Journal of Dairy Science* 73 (11): 3258-3265.
- Busarelli, P. S., M. F. de Sá Filho, C. M. Martins, L. F. Nasser, M. F.G. Nogueira, C. M. Barros, and G. A. Bó. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 65 (1): 77-88.

- Butler, S. T., S. H. Pelton, and W. R. Butler. 2004. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction* 127 (5): 537-545.
- Butler, W. R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 60–61: 449-457.
- Byrne, A. T., J. Southgate, D. R. Brison, and Leese H. J. 2002. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Molecular Reproduction and Development* 62 (4): 489-495.
- Carvalho, J. B. P., N. A. T. Carvalho, E. L. Reis, M. Nichi, A. H. Souza, and P. S. Baruselli. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* $\times$ *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* 62 (2): 167-175.
- Caton, D., R. M. Abrams, L. K. Lackore, G. James, and D. H. Barron. 1974. Effect of exogenous progesterone on the rates of uterine blood flow and oxygen consumption of sheep in early pregnancy. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 59 (3): 233-239.
- Cecim, M., J. Kerr, and A. Bartke. 1995. Effects of bovine growth hormone (bGH) transgene expression or bGH treatment on reproductive functions in female mice. *Biology of Reproduction* 52 (5): 1144-1148.
- Chaiyabutr, N., D. Boonsanit, and S. Chanpongsang. 2011. Effects of cooling and exogenous bovine somatotropin on hematological and biochemical parameters at different stages of lactation of crossbred Holstein Friesian cows in the tropics. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 24 (2): 230-238.
- Chandolia, R. K., E. M. Reinertsen, and P. J. Hansen. 1999a. Short communication: lack of breed differences in responses of bovine spermatozoa to heat shock. *Journal of Dairy Science* 82 (12): 2617-2619.
- Chandolia, R. K., M. R. Peltier, and P. J. Hansen. 1999b. Transcriptional control of development, protein synthesis and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos. *Biology of Reproduction* 61 (6): 1644-1648.
- Chaves, R. N., A. M. C. V. Alves, L. R. Faustino, K. P. L. Oliveira, C. C. Campello, C. A. P. Lopes, S. N. B  o, and J. R. Figueiredo. 2011. How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats. *Cell Tissue Research* 346 (3): 451-456.
- Chase, C. C. Jr., C. J. Kirby, A. C. Hammond, T. A. Olson, and M. C. Lucy. 1998. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. *Journal of Animal Science* 76 (1): 212-219.

- Chi, M. M., A. L. Schlein, and K. H. Moley. 2000. High insulin-like growth factor I (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology* 141 (12): 4784-4792.
- Cincovic, M. R., B. Belić, B. Toholj, A. Potkonjak, M. Stevančević, B. Lako, and I. Radović. 2011. Metabolic acclimation to heat stress in farm housed Holstein cows with different body condition scores. *African Journal of Biotechnology* 10 (49): 10293-10303.
- Clemente, M., J. de La Fuente, T. Fair, A. Al Naib, A. Gutierrez-Adan, J. F. Roche, D. Rizos, and P. Lonergan. 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction* 138 (3): 507-517.
- Collier, R. J., D. K. Beede, W. W. Thatcher, L. A. Israel, and C. J. Wilcox. 1982. Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. *Journal of Dairy Science* 65 (11): 2213-2227.
- Cushman, R. A., J. D. DeSouza, V. S. Hedgpeth, and J. H. Britt. 1999. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. *Biology of Reproduction* 60 (2): 349-354.
- Danilovich, A. N., A. Bartke, and T. A. Winters. 2000. Ovarian follicle apoptosis in bovine growth hormone transgenic mice. *Biology of Reproduction* 62 (1): 103-107.
- Davis, R. L., A. Arteaga, and J. F. Hasler. 2011. Addition of equine chorionic gonadotropin to a traditional follicle stimulating hormone protocol for superovulation of *Bos taurus* beef cows. *Reproduction, Fertility and Development* 24 (1): 224-225.
- De Castro e Paula, L. A., and P. J. Hansen. 2008. Ceramide inhibits development and cytokinesis and induces apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 75 (6): 1063-1070.
- De la Sota, R. L., M. C. Lucy, C. R. Staples, and W. W. Thatcher. 1993. Effects of recombinant bovine somatotropin (Sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 79 (4): 1002-1013.
- Derar, R., H. A. Hussein, S. Fahmy, T. M. El-Sherry, and G. Megahed. 2012. The effect of parity on the efficacy of an ovulation synchronization (Ovsynch) protocol in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproduction* 9 (1): 52-60.
- De Vries, A., and C. A. Risco. 2005. Trends and seasonality of reproductive performance in Florida and Georgia dairy herds from 1976 to 2002. *Journal of Dairy Science* 88 (9): 3155-3165.

- Dikmen, S., and P. J. Hansen. 2009. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? *Journal of Dairy Science* 92 (1): 109-116.
- Djordjević, J., G. Cvijić, and V. Davidović. 2003. Different activation of ACTH and corticosterone release in response to various stressors in rats. *Physiological Research* 52 (1): 67-72.
- Dor, J., I. Ben-Shlomo, B. Lunenfeld, C. Pariente, D. Levran, A. Karasik, M. Seppälä, and S. Mashiach. 1992. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) may not be essential for ovarian follicular development: evidence from IGF-I deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 74 (3): 539-542.
- Drakakis, P., D. Loutradis, S. Milingos, S. Michalas, K. Kallianidis, R. Bletsas, D. Aravantinos, and A. A. Kiessling. 1995. A preliminary study of the effect of growth hormone on mouse preimplantation embryo development in vitro. *Gynecologic Obstetric Investigation* 40 (4): 222-226.
- Dreiling, C. E., F. S. Carman, and D. E. Brown. 1991. Maternal endocrine and fetal metabolic responses to heat stress. *Journal of Dairy Science* 74 (1): 312-327.
- Dupont, J., V. Maillard, S. Coyral-Castel, C. Ramé, and P. Froment. 2010. Ghrelin in female and male reproduction. *International Journal of Peptides* 2010: 1-8.
- Ealy, A., D., J. L. Howell, V. H. Monterroso, C. F. Arechhiga, and P. J. Hansen. 1995. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. *Journal of Animal Science* 73 (5): 1401-1407.
- Ealy, A., D., M. Drost, and P. J. Hansen. 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *Journal of Dairy Science* 76 (10): 2899-2905.
- Echternkamp, S. E., L. J. Spicer, K. E. Gregory, S. F. Canning, and J. M. Hammond. 1990. Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biology of Reproduction* 43 (1): 8-14.
- Edwards, J. L., T. C. Hughey, A. B. Moore, and N.M. Cox. 1996. Depletion of insulin in streptozocin-induced-diabetic pigs alters estradiol, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF binding proteins in cultured ovarian follicles. *Biology of Reproduction* 55 (4): 775-781.
- Edwards, L., and P. J. Hansen. 1997. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Molecular Reproduction and Development* 46 (2): 138-145.

- Edwards, J. L., A. D. Ealy, V. H. Monterroso, and P. J. Hansen. 1997. Ontogeny of temperature-regulated Heat Shock Protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 48 (1): 25-33.
- Einspanier, R., A. Miyamoto, D. Schams, M. Müller, and G. Brem. 1990. Tissue concentration, mRNA expression and stimulation of IGF-I in luteal tissue during the oestrous cycle and pregnancy of cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 90 (2): 439-445.
- Eisemann, J. H., A. C. Hammond, D. E. Bauman, P. J. Reynolds, S. N. McCutcheon, H. F. Tyrrell, and G. L. Haaland. 1986a. Effect of bovine hormone administration on metabolism of growing Hereford heifers: protein and lipids metabolism and plasma concentrations of metabolites and hormones. *Journal of Nutrition* 116 (12): 2504-2515.
- Eisemann, J. H., H. F. Tyrrell, A. C. Hammond, P. J. Reynolds, D. E. Bauman, G. L. Haaland, J. P. McMurtry, and G. A. Varga. 1986b. Effect of bovine growth hormone administration on metabolism of growing Hereford heifers: dietary digestibility, energy and nitrogen balance. *Journal of Nutrition* 116 (1): 157-163.
- Elkarib, A. O., H. O. Garland, and R. Green. 1983. Acute and chronic effects of progesterone and prolactin on renal function in the rat. *The Journal of Physiology* 337: 389-400.
- El-Nouty, F. D., I. M. Elbanna, T. P. Davis, and H. D. Johnson. 1980. Aldosterone and ADH responses to heat and dehydration in cattle. *Journal of Applied Physiology* 48 (2): 249-255.
- Elvinger, F., R. P. Natzke, and P. J. Hansen. 1992. Interactions of heat stress and bovine somatotropin affecting physiology and immunology of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 75 (2): 449-462.
- Erickson, B. H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science* 25 (3): 800-805.
- Erickson, G. F., V. G. Garzo, and D. A. Magoffin. 1989. Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 69 (4): 716-724.
- Erdman, R. A., B. K. Sharma, R. D. Shaver, and R. M. Cleale. 1990. Dose response to recombinant bovine somatotropin from weeks 15 to 44 postpartum in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 73 (10): 2907-2915.
- Fajer, A. B., M. Holzbauer, and H. M. Newport. 1971. The contribution of the adrenal gland to the total amount of progesterone produced in the female rat. *The Journal of Physiology* 214 (1): 115-126.

- Fear, J., and P. J. Hansen. 2011. Developmental changes in expression of genes involved in regulation of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *Biology of Reproduction* 84 (1): 43-51.
- Ferreira, R., J. F. Oliveira, R. Fernandes, J. F. Moraes, and P. B. Goncalves. 2007. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction* 134 (5): 713-719.
- Findlay, J. K. 1993. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biology of Reproduction* 48 (1): 15-23.
- Ford, S. 1982. Control of uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of ewes, sows and cows. *Journal of Animal Science* 55 (2): 32-42.
- Forde, N., F. Carter, T. Fair, M. A. Crowe, A. C. O. Evans, T. E. Spencer, F. W. Bazer, R. McBride, M. P. Boland, P. O'Gaora, P. Lonergan, and J. F. Roche. 2009. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biology of Reproduction* 81 (4): 784-794.
- Fortune, J. E., and S. M. Quirk. 1988. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *Journal of Animal Science* 66 (2): 1-8.
- Frei, R. E., G. A. Schultz, and R. B. Church. 1989. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 86 (2): 637-641.
- Gaber, S. S., E. Elgindy, M. A. Elrehany, H. M. Abd-Elghany, A. M. Okasha, and S. S. Mahgoub. 2011. The evaluation of the role of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene polymorphism in controlling ovarian hyperstimulation. *Journal of American Science* 7 (10): 91-100.
- Gendelman, M., A. Aroyo, S. Yavin, and Z. Roth. 2010. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 140 (1): 73-82.
- Gilad, E., R. Median, A. Berman, Y. Graber, and D. Wolfenson. 1993. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 99 (2): 315-321.
- Geisert, R. D., T. C. Fox, G. L. Morgan, M. E. Wells, R. P. Wettemann, and M. T. Zavy. 1991. Survival of bovine embryos transferred to progesterone-treated asynchronous recipients. *Journal of Reproduction and Fertility* 92 (2): 475-482.
- Goodwin, N., V. Hayssen, D. W. Deakin, and A. P. F Flint. 1998. Influence of social status on ovarian function in farmed Red Deer (*Cervus elaphus*). *Physiology and Behavior* 65 (4-5): 691-696.

- Gong, J. G., G. Baxter, T. A. Bramley, and R. Webb. 1997. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *Journal of Reproduction and Fertility* 110 (1): 91-97.
- Gong, J. G., T. A. Bramley, I. Wilmut, and R. Webb. 1993a. Effect of recombinant bovine somatotrophin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biology of Reproduction* 48 (5): 1141-1149.
- Gong, J. G., T. A. Bramley, and R. Webb. 1993b. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 97 (1): 247-254.
- Gonzalez, A., H. Wang, T. D. Carruthers, B. D. Murphy, and R. J. Mapletoft. 1994. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *The Canadian Veterinary Journal* 35 (3): 158-162.
- Gossen, N., S. Fietze, S. Mösenfechtel, and M. Hoedemaker. 2006. Relationship between body condition (back fat thickness and body condition scoring) and fertility in dairy cows (German Black Pied/HF). *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 113 (5): 171-172.
- Goto, K., Y. Nakanishi, S. Ohkutsu, K. Ogawa, K. M. Tasaki, M. Ohta, S. Inohae, S. Tateyama, and T. Kawabata. 1987. Plasma progesterone profiles and embryo quality in superovulated Japanese Black cattle. *Theriogenology* 27 (5): 819-826.
- Gradela, A., C. R. Esper, and R. E. A. A. Silva. 1996. Plasma concentrations of progesterone, 17-beta-estradiol and androstenedione and superovulatory response of Nelore cows (*Bos indicus*) treated with FSH. *Theriogenology* 45 (4): 843-850.
- Greisen, S., T. Ledet, and P. Ovesen. 2001. Effects of androstenedione, insulin and luteinizing hormone on steroidogenesis in human granulosa luteal cells. *Human Reproduction* 6 (10): 2061-2065.
- Grings, E. E., D. M. deAvila, R. G. Eggert, and J. J. Reeves. 1990. Conception rate, growth, and lactation of dairy heifers treated with recombinant somatotrophin. *Journal of Dairy Science* 73 (1): 73-77.
- Gross, S. A., J. M. Newton, and F. M. Hughes, Jr. 2001. Decreased intracellular potassium levels underlie increased progesterone synthesis during ovarian follicular atresia. *Biology of Reproduction* 64 (6): 1755-1760.
- Guzeloglu, A., J. D. Ambrose, T. Kassa, T. Diaz, M. J. Thatcher, and W. W. Thatcher. 2001. Long term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Animal Reproduction* 66 (1-2): 15-34.

- Gwazdauskas, F. C., W. W. Thatcher, and C. J. Wilcox. 1972. Adrenocorticotropin alteration of bovine peripheral plasma concentrations of cortisol, corticosterone, and progesterone. *Journal of Dairy Science* 55 (8): 1165-1169.
- Gwazdauskas, F. C., W. W. Thatcher, and C. J. Wilcox. 1973. Physiological, environmental, and hormonal factors at insemination which may affect conception. *Journal of Dairy Science* 56 (7): 873-877.
- Haimovitz-Friedman, A., R. N. Kolesnick, and Z. Fuks. 1997. Ceramide signaling in apoptosis. *British Medical Bulletin* 53 (3): 539-553.
- Hamudikuwanda, H., G. Gallo, E. Block, and B. R. Downey. 1996. Adipose tissue progesterone concentrations in dairy cows during late pregnancy and early lactation. *Animal Reproduction Science* 43 (1): 15-23.
- Hansen, J. R. Ruedy, Mki. Sato, and K. Lo. 2002: Global warming continues. *Science* 295: 275 (Abstract).
- Hansen, J., R. Ruedy, Mki. Sato, and K. Lo. 2010: Global surface temperature change. *Reviews of Geophysics* 48 (4): 1-29.
- Harvey, M. B., and P. L. Kaye. 1992. Mediation of the actions of insulin and insulin-like growth factor-I on preimplantation mouse embryos in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 33 (3): 270-275.
- Harvey, M. B., and P. L. Kaye. 1991. Mouse blastocysts respond metabolically to short-term stimulation by insulin and IGF-1 through the insulin receptor. *Molecular Reproduction and Development* 29 (3): 253-258.
- 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 (9): 1919-1928.
- Hayashida, T., K. Murakami, K. Mogi, M. Nishihara, M. Nakazato, M. S. Mondal, Y. Horii, M. Kojima, K. Kangawa, and N. Murakami. 2001. Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domestic Animal Endocrinology* 21 (1): 17-24.
- Herrier, A., R. Einspanier, D. Schams, and H. Niemann. 1994. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology* 41 (3): 601-611.
- Herrler, A., C. A. Krusche, and H. M. Beier. 1998. Insulin and Insulin-like Growth Factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biology of Reproduction* 59 (6): 1302-1310.
- Herrler, A., F. Elsaesser, and H. Niemann. 1990. Rapid milk progesterone assay as a tool for the selection of potential donor cows prior to superovulation. *Theriogenology* 33 (2): 415-422.

- Hibbert, M. L., R. L. Stouffert, D. P. Wolf, and M. B. Zelinski-Wooten. 1996. Midcycle administration of a progesterone synthesis inhibitor prevents ovulation in primates. *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America* 93 (5): 1897-1901.
- Homburg, R., C. West, T. Torresani, and H. S. Jacobs. 1990. Cotreatment with human growth hormone and gonadotropins for induction of ovulation: a controlled clinical trial. *Fertility and Sterility* 53 (2): 254-260.
- Horrobin, D. F. 1980. Prolactin as a regulator of fluid and electrolyte metabolism in mammals. *Federation Proceedings* 39 (8): 2567-2570.
- Hussain, S. M., J. W. Fequay, and M. Younas. 1992. Estrous cyclicity in nonlactating and lactating Holsteins and Jerseys during a Pakistani summer. *Journal of Dairy Science* 75 (11): 2968-2975.
- Hutchinson, L. A., J. K. Findlay, and A. C. Herington. 1988. Growth hormone and insulin-like growth factor-I accelerate PMSG-induced differentiation of granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 55 (1): 61-69.
- Ireland, J. J., A. E. Zielak-Steciwko, F. Jimenez-Krassel, J. Folger, A. Bettegowda, D. Scheetz, S. Walsh, F. Mossa, P. G. Knight, G. W. Smith, P. Lonergan, and A. C. O. Evans. 2009. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biology of Reproduction* 80 (5): 954-964.
- Ireland, J. J., F. Ward, F. Jimenez-Krassel, J. L. H. Ireland, G. W. Smith, P. Lonergan, and A. C. O. Evans. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction* 22 (6): 1687-1695.
- Itoh, F., Y. Obara, M. T. Rose, H. Fuse, and H. Hashimoto. 1998. Insulin and glucagon secretion in lactating cows during heat exposure. *Journal of Animal Science* 76 (8): 2182-2189.
- Izadyar, F., B. Colenbrander, and M. M. Bevers. 1996. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Molecular Reproduction and Development* 45 (3): 372-377.
- Izadyar, F., B. Colenbrander, and M. M. Bevers. 1997a. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through the cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate signaling pathway. *Biology of Reproduction* 57 (6): 1484-1489.
- Izadyar, F., H. T. 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 (3): 247-255.

- Izadyar, F., H. T. Van Tol, B. Colenbrander, and M. M. Bevers. 1997b. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Molecular Reproduction and Development* 47 (2): 175-180.
- Izadyar, F., W. J. Hage, B. Colenbrander, and M. M. Bevers. 1998. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Molecular Reproduction and Development* 49 (4): 444-453.
- Jabbour, H. N., and P. A. Kelly. 1997. Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific regulation of prolactin function. *Reviews of Reproduction* 2 (1): 14-18.
- Jamnongjit, M., and S. R. Hammes. 2006. Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell Cycle* 5 (11): 1178-1183.
- Jessus, C., and R. Ozon. 2004. How does *Xenopus* oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation? *Biology of the Cell* 96 (3): 187-192.
- Jia, X.-C., J. Kalmijn, and A. J. W. Hsueht. 1986. Growth hormone enhances follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 118 (4): 1401-1409.
- Jousan, F. D., L. A. de Castro e Paula, J. Block, and P. J. Hansen. 2007. Fertility of lactating dairy cows administered recombinant bovine somatotropin during heat stress. *Journal of Dairy Science* 90 (1): 341-351.
- Jousan, F. D., M. Drost, and P. J. Hansen. 2005. Factors associated with early and mid-to-late fetal loss in lactating and no lactating Holstein cattle in a hot climate. *Journal of Animal Science* 83 (5): 1017-1022.
- Jousan, F. D., and P. J. Hansen. 2004. Insulin like factor-I as survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biology of Reproduction* 71 (5): 1665-1670.
- Jo, M., and J. E. Fortune. 2002. Oxytocin inhibits LH-stimulated production of androstenedione by bovine theca cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 188 (1-2): 151-159.
- Kadzere, C. T., M. R. Murphy, N. Silanikove, and E. Maltz. 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science* 77 (1): 59-91.
- Kanitz, W., F. Becker, F. Schneider, E. Kanitz, C. Leiding, H.-P. Nohner, and R. Pöhland. 2002. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reproduction, Nutrition, Development* 42 (6): 587-599.

- Karkanaki, A., C. Vosnakis, and D. Panidis. 2011. The clinical significance of anti-Müllerian hormone evaluation in gynecological endocrinology. *Hormones* 10 (2): 95-103.
- Katagiri, S., Y. S. Moon, and B. H. Yuen. 1996. The role of the uterine insulin-like growth factor I in early embryonic loss after superovulation in the rat. *Fertility and Sterility* 65 (2): 426-436.
- Katagiri, S., Y. Takahashi, M. Hishinuma, H. Kanagawa, O. Dochi, and H. Takakura. 1991. PMSG profiles in superovulated and anti-PMSG antiserum treated mice and heifers with enzymeimmunoassay. *The Japanese Journal of Veterinary Research* 39 (1): 11-21.
- Kidson, A., F. J. Rubio-Pomar, A. Van Knegsel, H. T. A. Van Tol, W. Hazeleger, D. W. B. Ducro-Steverink, B. Colenbrander, S. J. Dieleman, and M. M. Bevers. 2004. Quality of porcine blastocysts produced in vitro in the presence or absence of GH. *Reproduction* 127 (2): 165-177.
- Kimura, K., M. Hirako, H. Iwata, M. Aoki, M. Kawaguchi, and M. Seki. 2007. Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology* 68 (4): 633-639.
- King, W. A., A. Niar, I. Chartrain, K. J. Betteridge, and P. Guay. 1988. Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 82 (1): 87-95.
- Kirby, C. J., M. F. Smith, D. H. Keisler, and M. C. Lucy. 1997. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-released bovine somatotropin. *Journal of Dairy Science* 80 (2): 273-285.
- Kirkwood, R. N., P. A. Thacker, A. D. Gooneratne, B. L. Guedo, and B. Laarveld. 1988. The influence of exogenous growth hormone on ovulation rate in gilts. *Canadian Journal of Animal Science* 68 (4): 1097-1103.
- Kirkwood, R. N., P. A. Thacker, B. L. Guedo, and B. Laarveld. 1989. The effect of exogenous growth hormone on the endocrine status and the occurrence of estrus in gilts. *Canadian Journal of Animal Science* 69 (4): 931-937.
- Kirkwood, R. N., P. A. Thacker, B. L. Guedo, and B. Laarveld. 1990. Effect of exogenous growth hormone during the follicular phase on hCG binding by porcine luteal tissue. *Canadian Journal of Animal Science* 70 (2): 719-721.
- Klok, M. D., S. Jakobsdottir, and M. L. Drent. 2007. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews* 8 (1): 21-34.
- Kolesnick, R. N., and M. Krönke. 1998. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annual Review of Physiology* 60: 643-665.

- Kölle, S., M. Stojkovic, G. Boie, E. Wolf, and F. Sinowatz. 2002. Growth hormone inhibits apoptosis in *in vitro* produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 61 (2): 180-186.
- Kölle, S., M. Stojkovic, K. Prella, M. Waters, W. Eckhard, and F. Sinowatz. 2001. Growth hormone (GH)/GH receptor expression and GH-mediated effects during early bovine embryogenesis. *Biology of Reproduction* 64 (6): 1826-1834.
- Koto, V., J. Djordjeviæ, G. Cvijiæ, and V. Davidoviæ. 2004. Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: a morphological and stereological study. *The Journal of Experimental Biology* 207 (Pt-24): 4225-4230.
- 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 (5): 1003-1013.
- Leese, H. J., R. G. Sturme, C. G. Baumann, and T. G. McEvoy. 2007. Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Human Reproduction* 22 (12): 3047-3050.
- Lefebvre, M. D., and E. Block. 1992. Effect of recombinant bovine somatotropin on estradiol-induced estrous behavior in ovariectomized heifers. *Journal of Dairy Science* 75 (6): 1461-1464.
- León, H. V., J. Hernández-Cerón, D. H. Keisler, and C. G. Gutierrez. 2004. Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *Journal of Animal Science* 82 (2): 445-451.
- Lewis, A. M., P. L. Kaye., R. Lising, and R. D. Cameron. 1992. Stimulation of protein synthesis and expansion of pig blastocysts by insulin in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* 4 (1): 119-123.
- Li, Q., F. Jimenez-Krassel, A. Bettgowda, J. J. Ireland, and G. W. Smith. 2007. Evidence that the preovulatory rise in intrafollicular progesterone may not be required for ovulation in cattle. *Journal of Endocrinology* 192 (3): 473-483.
- Lighten, A. D., K. Hardy, R. M. Winston, and G. E. Moore. 1997. Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* 47 (2): 134-139.
- Lopes, F. F. P., and P. J. Hansen. 2002b. Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295 (1): 37-42.

- Lopes, F. F. P., and P. J. Hansen. 2002a. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biology of Reproduction* 66 (4): 1169-1177.
- Lopez, H. L., D. Satter, and M. C. Wiltbank. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 81 (3-4): 209-223.
- Loureiro, B., A. M. Brad, and P. J. Hansen. 2007. Heat shock and tumor necrosis-factor- α induce apoptosis in bovine pre implantation embryos through a caspase-9-dependent mechanism. *Reproduction* 133 (6): 1129-1137.
- Low, D., T. Cable, and A. Purvis. 2005. Exercise thermoregulation and hyperprolactinemia. *Ergonomics* 48 (11-14): 1547-1557.
- Lucy, M. C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal of Dairy Science* 84 (6): 1277-1293.
- Lucy, M. C., R. L. De La Sota, C. R. Staples, and W. W. Thatcher. 1993. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant somatotropin (Sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. *Journal of Dairy Science* 76 (4): 1014-1027.
- Lucy, M. C., T. L. Curran, R. J. Collier, and W. J. Cole. 1994. Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. *Theriogenology* 41 (2): 561-572.
- Lublin, A., and D. Wolfenson. 1996. Lactation and pregnancy effects on blood flow to mammary and reproductive systems in heat stressed rabbits. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Physiology* 115 (4): 277-285.
- Luna-Dominguez, J. E., R. M. Enns, D. V. Armstrong, and R. L. Ax. 2000. Reproductive performance of Holstein cows receiving somatotropin. *Journal of Dairy Science* 83 (7): 1451-1455.
- Macedo, G. G., C. E. S. N. Zúccari, U. G. P. de Abreu, J. A. Negrão, and E. V. da C. e Silva. 2011. Human–animal interaction, stress, and embryo production in *Bos indicus* embryo donors under tropical conditions. *Tropical Animal Health Production* 43 (6): 1175-1182.
- Magoffin, D. A., and S. R. Weitsman. 1994. Insulin-like growth factor I regulation of Luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biology of Reproduction* 51 (4): 766-775.
- Maia, A. S. C., R. G. da Silva, and C. M. B. Loureiro. 2005. Sensible and latent heat loss from the body surface of Holstein cows in a tropical environment. *International Journal of Biometeorology* 50 (1): 17-22.

- Makarevich, A. V., and A. V. Sirotkin. 1997. The involvement of the GH/IGF-I axis in the regulation of secretory activity by bovine oviduct epithelial cells. *Animal Reproduction Science* 48 (2-4): 197-207.
- Makarevich, A. V., and A. V. Sirotkin. 2000. Presumptive mediators of growth hormone action on insulin-like growth factor I release by porcine ovarian granulosa cells. *Biological Signals and Receptors* 9 (5): 248-254.
- Makarevich, A. V., and M. Markkula. 2002. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biology of the Reproduction* 66 (2): 386-392.
- Malhi, P. S., G. P. Adams, and J. Singh. 2005. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biology of Reproduction* 73 (1): 45-53.
- Mallone, P. G., D. K. Beede, R. J. Collier and C. J. Wilcox. 1985. Production and physiological responses of dairy cows to varying dietary potassium during heat stress. *Journal of Dairy Science* 68 (6): 1479-1487.
- Mapletoft, R. J., B. S. Kristina, and A. P. Gregg. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction, Nutrition, Development* 42 (6): 601-611.
- Mattos, M. C. C., M. R. Bastos, M. M. Guardieiro, J. O. Carvalho, M. M. Franco, G. B. Mourão, C. M. Barros, and R. Sartori. 2011. Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. *Animal Reproduction Science* 125 (1-4): 119-123.
- Matsui, M., Y. Takahashi, M. Hishinuma, and H. Kanagawa. 1995a. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized in vitro. *The Journal of Veterinary Medical Science* 57 (6): 1109-1111.
- Matsui, M., Y. Takahashi, M. Hishinuma, and H. Kanagawa. 1995b. Stimulatory effects of insulin on the development of bovine embryos fertilized in vitro. *The Journal of Veterinary Medical Science* 57 (2): 331-336.
- Matsuzuka, T., M. Ozawa, A. Nakamura, A. Ushitani, M. Hirabayashi, and Y. Kanai. 2005. Effects of heat stress on the redox status in the oviduct and early embryonic development in mice. *Journal of Reproduction and Development* 51 (2): 281-287.
- Mei, C., M. Y. Li, S. Q. Zhong, Y. Lei, and Z. D. Shi. 2009. Enhancing embryo yield in superovulated Holstein heifers by immunization against inhibin. *Reproduction in Domestic Animals* 44 (5): 735-739.

- Menashe, Y., J. Sack, and S. Mashiach. 1991. Spontaneous pregnancies in two women with Laron-type dwarfism: are growth hormone and circulating insulin-like growth factor mandatory for induction of ovulation? *Human Reproduction* 6 (5): 670-671.
- Menzer, C., and D. Schams. 1979. Radioimmunoassay for PMSG and its application to *in-vivo* studies. *Journal of Reproduction and Fertility* 55 (2): 339-345.
- Mihm, M., and E. C. L. Bleach. 2003. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science* 78 (3-4): 217-237.
- Monniaux, D., P. Monget, N. Besnard, C. Huet, and C. Pisselet. 1997. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology* 47 (1): 3-12.
- Moor, R. M., J. C. Osborn, and I. M. Crosby. 1985. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *Journal of Reproduction and Fertility* 74 (1): 167-172.
- Morales-Roura, J. S., L. Zarco, J. Hernández-Cerón, 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 (9): 1831-1841.
- Morera, P., L. Basirico, K. Hosoda, and U. Bernabucci. 2012. Chronic heat stress up-regulates leptin and adiponectin secretion and expression and improves leptin, adiponectin and insulin sensitivity in mice. *Journal of Molecular Endocrinology* 48 (2): 129-138.
- Moreira, F., L. Badinga, 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 (4): 1371-1387.
- Murdoch, W. J., T. A. Peterson, E. A. Van Kirk, D. L. Vincent, and E. K. Inskeep. 1986. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biology of Reproduction* 35 (5): 1187-1194.
- Nakajima, A., S. Hiraizumi, K. Onodera, H. Suzuki, Y. Kudo, and I. Domeki. 1992. The use of bovine anti-PMSG serum on beef cattle after PMSG-superovulation. *The Journal of Veterinary Medical Science* 54 (1): 95-98.
- National Agricultural Statistics Service. Consultado sábado 23 de abril del 2011. <http://www.nass.usda.gov/>
- National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. Seventh Revised Edition. National Academies Press, Washington, D.C.

- Oltenacu, P. A., and D. M. Broom. 2010. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare* 19 (S): 39-49.
- Opsomer, G., T. Wensing, H. Laevens, M. Coryn, and A. de Kruif. 1999. Insulin resistance: the link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows? *Animal Reproduction Science* 56 (3-4): 211-222.
- Ovesen, P. 1998. Synergistic effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on differentiation and replication of cultured human luteinized granulosa cells. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 77 (5): 487-491.
- Ovesen, P., H. J. Ingerslev, H. Orskov, and T. Ledet. 1994. Effect of growth hormone on steroidogenesis, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 production and DNA synthesis in cultured human luteinized granulosa cells. *Journal of Endocrinology* 140 (2): 313-319.
- Ozawa, K., H. Mizunuma, H. Ozawa, and Y. Ibuki. 1996. Recombinant human growth hormone acts on intermediate-sized follicles and rescues growing from atresia follicles. *Endocrine Journal* 43 (1): 87-92.
- Ozawa, M., M. Hirabayashi, and Y. Kanai. 2002. Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. *Reproduction* 124 (5): 683-689.
- Ozawa, M., T. Matsuzuka, M. Hirabayashi, and Y. Kanai. 2004. Redox status of the oviduct and Cdc2 activity in 2-Cell stage embryos in heat-stressed mice. *Biology of Reproduction* 71 (1): 291-296.
- Palma, G. A., M. Müller, and G. Brem. 1997. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 110 (2): 347-353.
- Pantaleon, M., E. J. Whiteside, M. B. Harvey, R. T. Barnard, M. J. Waters, and P. L. Kaye. 1997. Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: a role of GH in early embryogenesis? *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 94 (10): 5125-5130.
- Paula-Lopes, F. F., C. C. Chase Jr, Y. M. Al-Katanani, C. E. Krininger III, R. M. Rivera, S. Tekin, A. C. Majewski, O. M. Ocon, T. A. Olson, and P. J. Hansen. 2003. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction* 125 (2): 285-294.

- Paul, S., K. Pramanick, S. Kundu, D. Kumar, and D. Mukherjee. 2010. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by IGF-I and insulin in common carp, *Cyprinus carpio*: stimulation of aromatase activity and P450arom gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* 315 (1–2): 95-103.
- Pavlok, A., L. Koutecká, P. Krejčí, T. Slavík, J. Cerman, J. Slaba, and D. Dorn. 1996. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. *Animal Reproduction Science* 41 (3-4): 183-192.
- Peggy, L. K., D. A. White, H. G. Leory, and K. G. Hubbard. 1998. The potential effects of climate changes on summer season dairy cattle milk production and reproduction. *Earth and Environmental Science* 23 (1): 21-36.
- Plotka, E. D., U. S. Seal, L. J. Verme, and J. J. Ozoga. 1982. Reproductive steroids in white-tailed deer. IV. Origin of progesterone during pregnancy. *Biology of Reproduction* 26 (2): 258-262.
- Plotka, E. D., U. S. Seal, L. J. Verme, and J. J. Ozoga. 1983. The adrenal gland in white-tailed deer: a significant source of progesterone. *The Journal of Wildlife Management* 47 (1): 38-44.
- Pralong, F. P. 2010. Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. *Molecular and Cellular Endocrinology* 324 (1-2): 82-88.
- Prelle, K., M. Stojkovic, K. Boxhammer, J. Motlik, D. Ewald, G. J. Arnold, and E. Wolf. 2001. Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) and long R³IGF-I differently affect development and messenger ribonucleic acid abundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors in in vitro produced bovine embryos. *Endocrinology* 142 (3): 1309-1316.
- Purwanto, B. P., Y. Abo, R. Sakamoto, F. Furumoto, and S. Yamamoto. 1990. Diurnal patterns of heat production and heart rate under thermoneutral conditions in Holstein Friesian cows differing in milk production. *Journal of Agricultural Science* 114 (2): 139-142.
- Putney, D. J., M. Drost, and W. W. Thatcher. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* 30 (2): 195-209.
- Quirk, S. M., R. G. Cowan, R. M. Harman, C.-L. Hu, and D. A. Porter. 2004. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. *Journal of Animal Science* 82 (E. Suppl.): E40-E52.
- Repaci, A., A. Gambineri, U. Pagotto, and R. Pasquali. 2011. Ghrelin and reproductive disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology* 340 (1): 70-79.

- Rico, C., C. Médigue, S. Fabre, P. Jarrier, M. Bontoux, F. Clément, and D. Monniaux. 2011. Regulation of anti-müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biology of Reproduction* 84 (3): 560-571.
- Rico, C., L. Drouilhet, P. Salvetti, R. Dalbiès-Tran, P. Jarrier, J. L. Touzé, E. Pillet, C. Ponsart, S. Fabre, and D. Monniaux. 2012. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reproduction, Fertility and Development* 24 (7): 932-944.
- Rico, C., S. Fabre, C. Médigue, N. di Clemente, F. Clément, M. Bontoux, J.-L. Touzé, M. Dupont, E. Briant, B. Rémy, J.-F. Beckers, and D. Monniaux. 2009. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biology of Reproduction* 80 (1): 50-59.
- Rieger, D., J. S. Walton, M. L. Goodwin, and W. H. Johnson. 1991. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 35 (5): 863-868.
- Rivera, F., C. Narciso, R. Olivera, R. L. A. Cerri, A. Correa-Calderon, R. C. Chebel, and J. E. P. Santos. 2010. Effect of bovine somatotropin (500 mg) administered at ten-day intervals on ovulatory responses, expression of estrus, and fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93 (4): 1500-1510.
- Rivera, M. R., K. L. Kelly, G. E. Erdos, and P. J. Hansen. 2003. Alterations in ultrastructural morphology of two cell bovine embryos produced *in vitro* and *in vivo* following a physiologically relevant heat shock. *Biology of Reproduction* 69: 2068-2077.
- Rivera, M. R., K. L. Kelly, G. E. Erdos, and P. J. Hansen. 2004. Reorganization of microfilaments and microtubules by thermal stress in two-cell bovine embryo. *Biology of Reproduction* 70 (6): 1852-1862.
- Rocha, A. R., D. Randel, J. R. Broussard, J. M. Lin, R. M. Blair, J. D. Roussel, R. A. Godke, and W. Hancel. 1998. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos Taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 49 (3): 657-665.
- Roman-Ponce, H., W. W. Thatcher, D. Caton, D. H. Barron, and C. J. Wilcox. 1978. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. *Journal of Animal Science* 46 (1): 175-180.

- Ronchi, B., G. Stradaoli, A. Verini-Supplizi, U. Bernabucci, N. Lacetera, P.A. Accorsi, A. Nardone, and E. Seren. 2001. Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol-17 β , LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers. *Livestock Production Science* 68 (2–3): 231-241.
- Rosenberg, M., Y. Folman, Z. Herz, I. Flamenbaum, A. Berman, and M. Kaim. 1982. Effect of climatic conditions on peripheral concentrations of LH, progesterone and oestradiol-17 β in high milk-yielding cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 66 (1): 139-146.
- Rosenberg, M., Z. Herz, M. Davidson, and Y. Folman. 1977. Seasonal variations in post-partum plasma progesterone levels and conception in primiparous and multiparous dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 51 (2): 363-367.
- Rozenboim, I., E. Tako, O. Gal-Garber, J. A. Proudman, and Z. Uni. 2007. The effect of heat stress on ovarian function of laying hens. *Poultry Science* 86: (8): 1760-1765.
- Roth, Z. 2008. Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 43 (2): 238-244.
- Roth, Z., and P. J. Hansen. 2004. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of Reproduction* 71 (6): 1898-1906.
- Roth, Z., and P. J. Hansen. 2005. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Society of Reproduction and Fertility* 129 (2): 235-244.
- Roth, Z., R. Median, A. Shaham-Albalancy, R. Braw-Tal, and D. Wlofenson. 2001. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 121 (5): 745-751.
- Roth, Z., R. Median, R. Brawl-Tal, and D. Wolfenson. 2000. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 120 (1): 83-90.
- Stefanello, J. R., M. H. Barreta, P. M. Porciuncula, J. N. Arruda, J. F. Oliveira, M. A. Oliveira, and P. B. Goncalves. 2006. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology* 66 (9): 2068-2076.
- Sá Filho, M. F., N. A. T. Carvalho, L. U. Gímenes, Torres-Júnior J.R., L. F. T. Nasser, H. Tonhati, J. M. Garcia, B. Gasparrinic, L. Zicarelli, and P. S. Baruselli. 2009. Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on *in vitro* buffalo embryo production. *Animal Reproduction Science* 113 (1-4): 51-59.

- Sakatani, M., S. Kobayashi, and M. Takahashi. 2004. Effects of heat shock on *invitro* development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* 67 (1): 77-82.
- Sallam, S. M. A., M. E. A. Nasser, and M. I. Yousef. 2005. Effect of recombinant bovine somatotropin administration on milk production, composition and some hemato-biochemical parameters of lactating goats. *Options Méditerranéennes Series A* (74): 291-297.
- Samartzi, F., S. Belibasaki, E. Vainas, and C. Boscos. 1995. Plasma progesterone concentration in relation to ovulation rate and embryo yield in Chios ewes superovulated with PMSG. *Animal Reproduction Science* 39 (1): 11-21.
- Sangsritavong, S., D. K. Combs, R. Sartori, L. E. Armentano, and M. C. Wiltbank. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 85 (11): 2831-2842.
- Santos, J. E. P., S. O. Juchem, R. L. A. Cerri, K. N. Galvao, R. C. Chevel, W. W. Thatcher, C. S. Dei, and C. R. Bilby. 2004. Effects of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87 (1): 868-881.
- Saumande, J., D. Tamboura, and D. Chupin. 1985. Changes in milk and plasma concentrations of progesterone in cows after treatment to induce superovulation and their relationships with number of ovulations and of embryos collected. *Theriogenology* 23 (5): 719-731.
- Scaramuzzi, R. J., B. K. Campbell, J. A. Downing, N. R. Kendall, M. Khalid, M. Muñoz-Gutiérrez, and A. Somchit. 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction, Nutrition, Development* 46 (4): 339-354.
- Schams, D., F. Graf, J. Meyer, B. Graule, M. Mauthner, and C. Wollny. 1990. Changes in hormones, metabolites, and milk after treatment with sometribove (recombinant methionyl bST) in Deutsches Fleckvieh and German Black and White cows. *Journal of Animal Science* 69 (4): 1538-1592.
- 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 (5-6): 815-821.
- Schneider, P. L., D. K. Beede, and C. J. Wilcox. 1986. Responses of lactating cows to dietary sodium source and potassium quantity during heat stress. *Journal of Dairy Science* 69 (1): 99-110.

- Schultz, G. A., A. Hogan, W. J. Watson, R. M. Smith, and S. Heyner. 1992. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 4 (4): 361-371.
- Sekar, N., H. A. Lavoie, and J. D. Veldhuis. 2000. Concerted regulation of steroidogenic acute regulatory gene expression by luteinizing hormone and insulin (or insulin-like growth factor I) in primary cultures of porcine granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 141 (11): 3983-3992.
- Settivari, R. S., J. N. Spain, M. R. Ellersieck, J. C. Byatt, R. J. Collier, and D. E. Spiers. 2007. Relationship of thermal status to productivity in heat-stressed dairy cows given recombinant bovine somatotropin. *Journal of Dairy Science* 90 (3): 1265-1280.
- Shimizu, T., I. Ohshima, M. Ozawa, S. Takahashi, A. Tajima, M. Shiota, H. Miyazaki, and Y. Kanai. 2005. Heat stress diminished gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. *Reproduction* 129 (4): 463-472.
- Sheikheldin, M. A., B. E. Howland, and W. M. Palmer. 1988. Effects of heat stress on serum progesterone in cyclic ewes and on progesterone and cortisol response to ACTH in ovariectomized ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 84 (2): 521-529.
- Siddiqui, M. A. R., M. Shamsuddin, M. M. M. U. Bhuiyan, M. A. Akbar, and K. M. Kamaruddin. 2002. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in Zebu cows. *Reproduction in Domestic Animals* 37 (1): 34-41.
- Simmons, K. R., and W. Hansel. 1964. Nature of the luteotropic hormone in the bovine. *Journal of Animal Science* 23: 136-141.
- Simpson, R. B., C. C. Chase, Jr., L. J. Spicer, R. K. Vernon, A. C. Hammond, and D. O. Rae. 1994. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 102 (2): 483-492.
- Sirotkin, A. V. 2005. Control of reproductive processes by growth hormone: extra- and intracellular mechanisms. *The Veterinary Journal* 170: 307-317.
- Sirotkin, A. V., and A. V. Makarevich. 1999. GH regulates secretory activity and apoptosis in culture bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase A system. *Journal of Endocrinology* 163 (2): 317-327.

- Sirotkin, A. V., and A. V. Makarevich. 2002. Growth hormone can regulate functions of porcine ovarian granulosa cells through the cAMP/protein kinase A system. *Animal Reproduction Science* 70 (1-2): 111-126.
- Sirotkin, A. V., and J. Nitray. 1994. Growth hormone and prolactin affect oxytocin, vasopressin, progesterone and cyclic nucleotide secretion by bovine granulosa cells in vitro. *Journal of Endocrinology* 143 (3): 417-422.
- Sirotkin, A. V., A. V. Makarevich, J. Pivko, and H. G. Genieser. 2002. Intracellular mechanisms of growth hormone action on apoptosis in cultured porcine ovarian granulosa cells. *Australian Journal of Animal Science* 15 (7): 1045-1050.
- Skibicka, K. P., C. Hansson, E. Egecioglu, and S. L. Dickson. 2011. Role of ghrelin in food reward: impact of ghrelin on sucrose self-administration and mesolimbic dopamine and acetylcholine receptor gene expression. *Addiction Biology* 17 (1): 95-107.
- Skinner, M. K. 2005. Regulation of primordial follicles assembly and development. *Human Reproduction Update* 11 (5): 461-471.
- Soodini, G. R., and O. Hamdy. 2004. Adiponectin and leptin in relation to insulin sensitivity. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 2 (2): 114-123.
- Song, Z., L. Liu, A. Sheikhahmadi, H. Jiao, and H. Lin. 2012. Effect of heat exposure on gene expression of feed intake regulatory peptides in laying hens. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 1-8.
- Songsasen, N., V. Yiengvisavakul, B. Buntaracha, S. Pharee, M. Apimeteetumrong, and Y. Sukwongs. 1999. Effect of treatment with recombinant bovine somatotropin on responses to superovulatory treatment in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 52 (3): 377-384.
- Spalding, R. W., R. W. Everett, and R. H. Foote. 1975. Fertility in New York artificial inseminated Holstein herds in dairy herd improvement. *Journal of Dairy Science* 58 (5): 718-723.
- Spencer, T. E., S. Olivier, and E. Wolf. 2008. Genes involved in conceptus–endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction* 135 (2): 165-179.
- Spicer, L. J., and C. C. Francisco. 1997. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 138 (8): 3374-3379.
- Spicer, L. J., and C. C. Francisco. 1998. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biology of Reproduction* 58 (1): 207-212.

- Spicer, L. J., and C. S. Chamberlain. 2000. Production of insulin-like growth factor-I by granulosa cells but not thecal cells is hormonally responsive in cattle. *Journal of Animal Science* 78 (11): 2919-2926.
- Spicer, L. J., and R. E. Stewart. 1996. Interaction among bovine somatotropin, insulin and gonadotropins on steroid production by bovine granulosa and thecal cells. *Journal of Dairy Science* 79 (5): 813-821.
- Srikandakumar, A., and E. H. Johnson. 2004. Effect of heat stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and Australian milk Zebu cows. *Tropical Animal Health and Production* 36 (7): 685-692.
- Stocco, C. 2012. The long and short of the prolactin receptor: the corpus luteum needs them both! *Biology of Reproduction* 86 (3): 1-2.
- Sugiyama, S., M. McGowan, M. Kafi, N. Philips, and M. Young. 2003. Effects of increased ambient temperature on the development of *in vitro* derived bovine zygotes. *Theriogenology* 60 (6): 1039-1047.
- Takahashi, Y., and H. Kanagawa. 1985. Inductions of superovulation using several FSH regimens in Holstein-Friesian heifers. *Japanese Journal of Veterinary Research* 33 (1-2): 45-50.
- Takedomi, T., H. Kishi, M. S. Medan, Y. Aoyagi, M. Konishi, T. Itoh, S. Yazawa, G. Watanabe, and K. Taya. 2005. Active immunization against inhibin improves superovulatory response to exogenous FSH in cattle. *Journal of Reproduction and Development* 51 (3): 341-346.
- Tamboura, D., D. Chupin, and J. Saumande. 1985. Superovulation in cows: A relationship between progesterone secretion before ovulation and the quality of embryos. *Animal Reproduction Science* 8 (4): 327-334.
- Tanaka, T., S. Nagatani, D. C. Bucholtz, S. Ohkura, H. Tsukamura, K.-I. Maeda, and D. L. Foster. 2000. Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. *Biology of Reproduction* 62 (5): 1256-1261.
- Terada, Y., T. Fukaya, M. Takahashi, and A. Yajima. 1996. Expression of growth hormone receptor in mouse preimplantation embryos. *Molecular Human Reproduction* 2 (11): 879-881.
- Thom, E., C. 1959. The discomfort index. *Weatherwise* 12 (2): 57-59.
- Thomas, F. H., B. K. Campbell, D. G. Armstrong, and E. E. Telfer. 2007. Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development *in vitro*. *Reproduction* 133 (6): 1121-1128.
- Thompson, F. N., and W. C. Wagner. 1974. Plasma progesterone and oestrogens in sheep during late pregnancy: contribution of the maternal adrenal and ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 41 (1): 57-66.

- Thompson, M., M. Ozawa, J. W. Bubolz, Q. Yang, and G. E. Dahl. 2011. Bovine luteal prolactin receptor expression: potential involvement in regulation of progesterone during the estrous cycle and pregnancy. *Journal of Animal Science* 89 (5): 1338-1346.
- Tyrrell, H. F., A. C. G. Brown, P. J. Reynolds, G. L. Haaland, D. E., C. J. Peel, and W. D. Steinhour. 1988. Effect of bovine somatotropin on metabolism of lactating dairy cows: energy and nitrogen utilization as determined by respiration calorimetry. *The Journal of Nutrition* 18 (8): 1024-1030.
- Uribe-Velásquez, L. F., E. Oba, L. H. de A. Brasil, F. N. de Sousa, e F. S. Wechsler. 2001. Efeitos do estresse térmico nas concentrações plasmáticas de progesterona (P4) e estradiol 17- β (E2) e temperatura retal em cabras da raça Pardo Alpina. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30 (2): 388-393.
- Vallet, J. L., K. A. Leymaster, and R. K. Christenson. 2002. The influence of uterine function on embryonic and fetal survival. *Journal of Animal Science* 80 (E. Suppl. 2): E115-E125.
- Vanholder, T., J. L. Leroy, A. V. Soom, G. Opsomer, D. Maes, M. Coryn, and A. de Kruif. 2005. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. *Animal Reproduction Science* 87 (1-2): 33-44.
- Vaught, L. W., D. E. Monty Jr., and W. C. Foote. 1977. Effect of summer heat stress on serum luteinizing hormone and progesterone values in Holstein-Friesian cows in Arizona. *American Journal of Veterinary Research* 38 (7): 1027-1030.
- Velazquez, M. A. 2011. The role of nutritional supplementation on the outcome of superovulation in cattle. *Animal Reproduction Science* 126 (1-2): 1-10.
- Visser, J. A., F. H. de Jong, J. S. E. Laven, and A. P. N. Themmen. 2006. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 131 (1): 1-9.
- Volpe, A., P. G. Artini, A. Barreca, F. Minuto, G. Coukos, and A. R. Genazzani. 1992. Effects of growth hormone administration in addition to gonadotrophins in normally ovulating women and polycystic ovary syndrome (PCO) patients. *Human Reproduction* 7 (10): 1347-1352.
- Webb, R., J. G. Gong, and T. A. Bramley. 1994. Role of Growth-Hormone and Intrafollicular Peptides in follicle development in cattle. *Theriogenology* 41 (1): 25-30.
- Welt, C., Y. Sidis, H. Keutmann, and A. Schneyer. 2002. Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling a paradigm for the new millennium. *Experimental Biology and Medicine* 227 (9): 724-752.

- West, J. W., B. G. Mullinix, and J. C. Johnson, Jr. 1990. Effects of bovine somatotropin on dry matter intake, milk yield, and body temperature in Holstein and Jersey cows during heat stress. *Journal of Dairy Science* 73 (10): 2896-2906.
- West, J. W., B. G. Mullinix, and T. G. Sandifer. 1991. Effects of bovine somatotropin on physiologic responses of lactating Holstein and Jersey cows during hot, humid weather. *Journal of Dairy Science* 74 (3): 840-851.
- Wheelock, J. B., R. P. Rhoads, M. J. VanBaale, S. R. Sanders, and L. H. Baumgard. 2010. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 93 (2): 644-655.
- Wilson, S. J., C. J. Kirby, A. T. Koenigsfeld, D. H. Keisler, and M. C. Lucy. 1998. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. *Journal of Dairy Science* 81 (8): 2124-2131.
- Wolfenson, D., W. W. Thatcher, L. Bandinga, J. D. Savio, R. Median, B. J. Braw-Tal, and A. Berman. 1995. Effect of heat stress on follicular development during the estrus cycle in lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction* 52 (5): 1106-1113.
- Yoshimura, Y., M. Iwashita, M. Karube, T. Oda, M. Akiba, S. Shiokawa, M. Ando, A. Yoshinaga, and Nakamura Y. 1994. Growth hormone stimulates follicular development by stimulating ovarian production of insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 135 (3): 887-894.
- Yoshimura, Y., Y. Nakamura, N. Koyama, M. Iwashita, T. Adachi, and Y. Takeda. 1993. Effects of growth hormone on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis. *Fertility and Sterility* 59 (4): 917-923.
- Zhang, B., M. Shozu, M. Okada, H. Ishikawa, T. Kasai, K. Murakami, K. Nomura, N. Harada, and M. Inoue. 2010. Insulin-like growth factor I enhances the expression of aromatase P450 by inhibiting autophagy. *Endocrinology* 151 (10): 4949-4958.
- Zhou, J., E. Chin, and C. Bondy. 1991. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology* 129 (6): 3281-3288.

3 RESPUESTA SUPERESTIMULATORIA DE VAQUILLAS HOLSTEIN TRATADAS CON DOS DOSIS DE SOMATOTROPINA

3.1 Resumen

La aplicación de una dosis de somatotropina bovina recombinante (rbST) puede mejorar la respuesta superestimuladora en bovinos. Esta investigación evaluó la aplicación de una contra dos dosis de 500 mg de rbST en animales superestimulados (donadoras) sobre el diámetro del folículo preovulatorio más grande, respuesta ovulatoria (incidencia de celo y número de cuerpos lúteos (CL)), producción de ovocitos y embriones; así como sobre el porcentaje de gestaciones en vacas receptoras. Las donadoras fueron 20 vaquillas Holstein, las cuales se asignaron a uno de dos grupos: 1) rbST-I, n=10: las vaquillas recibieron una inyección de rbST en el día -2 del programa de superestimulación (el día cero corresponde al día del celo); 2) rbST-II, n=10: las vaquillas recibieron una inyección de rbST en el día -10 y la segunda en el día -2 del programa de superestimulación. Las receptoras, 38 vacas Holstein, fueron asignadas a recibir un embrión de uno de los dos grupos de donadoras. El porcentaje de gestaciones en receptoras fue de 20% ($P>0.05$), para ambos grupos. En las donadoras, el diámetro del folículo preovulatorio más grande no fue afectado ($P>0.05$) (rbST-I, 12.8 ± 0.8 mm vs rbST-II, 12.9 ± 0.9 mm). La respuesta ovulatoria no fue afectada ($P>0.05$), 19 donadoras presentaron celo (rbST-I, $47.37 \pm 16.6\%$ vs rbST-II, $52.63 \pm 15.8\%$) y el número de CL fue similar en ambos grupos (rbST-I, 9.3 ± 1.1 vs rbST-II, 9.5 ± 1.5). El número de ovocitos fue mayor ($P \leq 0.05$) en el grupo rbST-I (1.3 ± 0.4 vs 0.2 ± 0.2). El número de embriones degenerados y transferibles no fue afectado ($P>0.05$) por el tratamiento: rbST-I, 1.0 ± 0.5 vs rbST-II, 4.5 ± 3.0 ; rbST-I, 1.0 ± 0.5 vs rbST-II, 1.4 ± 0.7 , respectivamente. Sin embargo, no se logró colectar ningún tipo de estructura (ovocito y/o embrión) de un 36.8% de las donadoras. Se concluye que la aplicación de dos dosis de rbST no tienen efecto sobre el diámetro del folículo preovulatorio más grande, ni sobre la respuesta ovulatoria de vaquillas Holstein superestimuladas.

Palabras clave: **somatotropina, superestimulación, vaquillas.**

Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera
Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Juan González Maldonado
Director: Raymundo Rangel Santos

SUPEROVULATORY RESPONSE OF HOLSTEIN HEIFERS TREATED WITH TWO DOSES OF SOMATOTROPIN

3.2 Abstract

The application of one dose of recombinant bovine somatotropin (rbST) helps to improve the superovulatory response in cattle. This study assessed the effect of applying one against two doses of 500 mg of rbST in superstimulated animals (donors) on the diameter of the largest preovulatory follicle, ovulatory response (incidence of estrus and number of corpus luteum (CL)), oocytes and embryo yield; as well as on the pregnancy rate in recipient cows. As donors, 20 Holstein heifers were used, each was assigned to one of two groups; 1) rbST-I, n=10: heifers received one dose of rbST on the day -2 of the superstimulation schedule (day zero is the day of estrus); 2) rbST-II, n=10: heifers received the first dose of rbST on day -10 and the second on day -2 of the superstimulation schedule. The recipients, 38 Holstein cows, were assigned to receive one embryo of one of the two groups of donors. There was not effect of treatment on the pregnancy rate of the recipients ($P>0.05$), 20% in both groups. There was not effect on diameter of the largest preovulatory follicle ($P>0.05$) (rbST-I, 12.8 ± 0.8 mm vs rbST-II, 12.9 ± 0.9 mm). There was not effect on the ovulatory response ($P>0.05$), 19 of the donors showed estrus (rbST-I, $47.37 \pm 16.6\%$ vs rbST-II, $52.63 \pm 15.8\%$), and the number of CL of the two groups was similar (rbST-I, 9.3 ± 1.1 vs rbST-II, 9.5 ± 1.5). The number of oocytes was greater ($P \leq 0.05$) in the rbST-I than in the rbST-II (1.3 ± 0.4 vs 0.2 ± 0.2). There was not effect ($P>0.05$) of treatment on the number of degenerated and transferable embryos: rbST-I, 1.0 ± 0.5 vs rbST-II, 4.5 ± 3.0 ; rbST-I, 1.0 ± 0.5 vs rbST-II, 1.4 ± 0.7 , respectively. However, not recovery of any structure (oocytes or/and embryos) occurred in 36.8% of the donors. It is concluded that the application of two doses of rbST has not effect on the diameter of the largest preovulatory follicle or on the ovulatory response of superstimulated Holstein heifers.

Key words: **somatotropin, superestimulation, heifers.**

Master of Science Thesis
Universidad Autónoma Chapingo
Author: Juan González Maldonado
Adviser: Raymundo Rangel Santos

3.3 Introducción

La transferencia de embriones es la técnica mediante la cual los embriones son colectados de una hembra donadora y transferidos a otra hembra receptora, la cual servirá como madre sustituta por el resto de la gestación (Widayati, 2012). El objetivo de un programa de transferencia de embriones es la obtención de ovocitos y embriones de alta calidad de hembras de elevado valor genético, que resulten en el nacimiento de una cría saludable (Santos *et al.*, 2008). Sin embargo, la variabilidad en la respuesta superestimuladora (número de cuerpos lúteos (CL) y número de estructuras tales como ovocitos, embriones degenerados y transferibles) es uno de los principales problemas de los programas de transferencia de embriones en bovinos (Mapletoft *et al.*, 2002).

La variabilidad en la respuesta superestimuladora puede deberse en parte a diferencias en la población folicular al inicio del tratamiento superestimulador (Chupin y Saumande, 1979). Esta variabilidad puede ser aminorada mediante el uso de somatotropina bovina recombinante (rbST) (Gong *et al.*, 1993b), probablemente debido a que la aplicación de ésta incrementa el reclutamiento de folículos pequeños (Gong *et al.*, 1993a). La aplicación de múltiples dosis de rbST (160 mg en total) durante el tratamiento superestimulador (Rieger *et al.*, 1991) o una sola (500 mg) al inicio de éste (Kuehner *et al.*, 1993) incrementó la respuesta ovulatoria (número de cuerpos lúteos); mientras que una sola aplicación (250-640 mg) siete (Kuehner *et al.*, 1993), cinco (Herrier *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1996) o cuatro días (Neves *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2011) antes de iniciar el programa de superestimulación así como 48 horas antes de la inseminación (Márquez, 2011) y después de ésta (Kuehner *et al.*, 1993; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2004) produjo o tiende a incrementar el número o porcentaje de embriones transferibles. Contrario a lo anterior, los trabajos de Herrier *et al.* (1994) y Borges *et al.* (2001) no encontraron un efecto positivo sobre la producción de embriones, al aplicar la

somatotropina (640 mg) al momento de la inseminación o (500 mg) siete días antes del tratamiento superestimulador, respectivamente. Por tanto, parece ser que los mejores momentos para la aplicación de la rbST para incrementar la producción de embriones transferibles, son en un tiempo menor a siete días antes de iniciar el tratamiento superestimulador y antes de la inseminación artificial.

La aplicación de una dosis de rbST puede mejorar la producción de embriones transferibles en bovinos. Sin embargo, dado que la aplicación de esta hormona produce un incremento en el reclutamiento de folículos pequeños (Gong *et al.*, 1997) así como en el crecimiento de otros de mayor tamaño (De la Sota *et al.*, 1993; Lucy *et al.*, 1994), es probable que la aplicación de más de una dosis sea benéfica tanto para la respuesta ovulatoria como para la producción de embriones transferibles en bovinos. La primera dosis, estaría enfocada a incrementar el número de folículos reclutados, los cuales podrían ser seleccionados y continuar su crecimiento bajo la influencia de la hormona superestimuladora, por ejemplo Folltropin-V (Hormona Foliculo Estimulante (FSH)), mientras que una segunda dosis, sería aplicada con el objetivo de incrementar el desarrollo de estos folículos cuando ya no se cuente con la fuente de la hormona superestimuladora, presumiblemente debido a que después de la aplicación de la rbST, esta hormona se mantiene en niveles elevados por un periodo de tiempo mayor que la FSH, después de aplicar Folltropin (Demoustier *et al.*, 1988; Kuehner *et al.*, 1993). Por tanto, el objetivo de este trabajo fue probar la hipótesis de que vaquillas superestimuladas y tratadas con dos dosis de rbST, aplicadas antes del celo, tendrían una mejor respuesta ovulatoria así como un mayor número de embriones transferibles en comparación con animales que recibieran una sola dosis.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Localización

El experimento se llevó a cabo en la Unidad de Producción de Bovino Lechero “18 de Julio”, propiedad de la Cooperativa Agropecuaria y Forestal Chapingo, ubicado en el municipio de Tlahualilo, Durango, en las coordenadas 25° 54′ 08″ latitud norte y 103° 35′ 07″ longitud oeste, a una altitud de 1,137 msnm, con clima cálido-seco BW. La temperatura media anual es de 21.1 °C con una precipitación pluvial de 239 mm anuales, distribuidas principalmente en los meses de julio a septiembre (García, 1988).

3.4.2 Animales

Los animales utilizados como donadoras fueron 20 vaquillas Holstein de 12 a 15 meses de edad y como receptoras se usaron 38 vacas Holstein adultas clínicamente sanas, con buena condición corporal y con presencia de ciclos estrales regulares.

3.4.3 Tratamiento y diseño experimental

Los tratamientos a evaluar en el grupo de donadoras fueron la aplicación de una dosis de 500 mg de rbST (Boosting-S, MSD) vía subcutánea en el pliegue izqueorectal contra dos dosis. Se realizaron dos programas de producción de embriones, uno en el mes de julio y el otro en septiembre, en cada mes se utilizaron 10 vaquillas, las cuales fueron distribuidas, mediante un diseño completamente al azar, a uno de dos grupos (n=5): 1) rbST-I: las donadoras recibieron una dosis de rbST en el día -2 del programa de superestimulación y 2) rbST-II: las donadoras recibieron la primera dosis de rbST en el día -10 y la segunda en el día -2 del programa de superestimulación (Figura 1). Cada

donadora fue tomada como unidad experimental. Las receptoras (n=38) fueron asignadas, mediante un diseño completamente al azar, a recibir un embrión de uno de los dos grupos de donadoras.

3.4.4 Sincronización de celos y programa de superestimulación

La sincronización del celo en las donadoras se llevó a cabo mediante un dispositivo intravaginal que contenía 1.9 g de progesterona (CIDR®, Pfizer), la aplicación de benzoato de estradiol (Benzoato de estradiol, International Prode) y cloprostenol (Celosil® Shering Plough) en dos ocasiones (am y pm) en el día que se retiró el CIDR. La superestimulación se indujo mediante múltiples inyecciones de hormona folículo estimulante (FSH, Folltropin-V Bioniche, Animal Health, Canada, Inc) en un protocolo descendente (50, 50, 40, 40, 30, 30, 20, 20 mg) a intervalos de 12 h. La detección de celos se realizó de manera permanente después de retirado el CIDR. Al momento del celo se determinó el diámetro del folículo preovulatorio más grande, mediante la medición del folículo de mayor tamaño (se consideró el promedio de la medición vertical y horizontal del folículo), en ambos ovarios, por medio de ultrasonografía (Sonovet 2000, Madison Wisconsin). Las vaquillas fueron inseminadas en tres ocasiones (12, 18 y 24 h después de detectado el celo) con semen sexado proveniente de machos de fertilidad conocida, al momento de la primera inseminación cada donadora recibió una inyección de gonadorelina (Cystorelin®, Merial) (Figura 1).

El grupo de receptoras fue sincronizado, al igual que las donadoras, mediante un CIDR por ocho días, la aplicación de benzoato de estradiol en el día de la inserción del CIDR y una aplicación de cloprostenol al removerlo (Figura 1). Seis días después del celo, los ovarios de todas las vacas fueron evaluados para determinar la posición del cuerpo lúteo, mediante ultrasonografía (Sonovet 2000, Madison Wisconsin).

3.4.5 Evaluación y transferencia de embriones

Los embriones de las donadoras fueron extraídos a los 7.5 días después del celo, mediante procedimientos no quirúrgicos. Cada donadora recibió anestesia epidural, mediante la aplicación de 100 mg de lidocaína (Pisacaina 2%, Pisa), para posteriormente proceder al lavado y secado externo de la vulva. Acto seguido, el técnico procedió a la evaluación de la respuesta ovulatoria, a través del conteo del número de CL de cada ovario, mediante palpación rectal. En seguida, con la ayuda de un estilete de acero inoxidable de 63.5 cm de largo, se hizo pasar un catéter Foley No. 16 (C. R. Bard, Inc) a través del cérvix para posicionar la punta de este último en uno de los cuernos, por delante de la bifurcación uterina, una vez en esta posición se infló el globo del catéter con la cantidad de aire considerada como adecuada (5-8 cm de aire), calculada por el técnico a través de la palpación de la distensión del cuerno. Después de posicionar el catéter, se retiró el estilete de acero y se conectó un extremo de una manguera Tygon (Agtech) al catéter de Foley, mientras que los otros dos extremos se posicionaron, uno en la bolsa de medio de lavado (Vigro complete flush, Bioniche) y el otro en el filtro EM-CON (Agtech), en el cual se colectaron los embriones. Después de finalizar con el lavado de un cuerno, se posicionó nuevamente el estilete dentro del catéter de Foley, se desinfló el globo y se posicionó en el otro cuerno para proceder a su lavado.

El contenido del filtro EM-CON fue vertido en una caja cuadrículada de 10 x 15 cm (Falcon, Becton Dickinson Labware) para la búsqueda de ovocitos y embriones, bajo el lente de un microscopio estereoscópico (Cambridge instruments), las estructuras encontradas fueron colocadas en una caja petri de 3.5 x 1 cm (Falcon, Becton Dickinson Labware) que contenía medio de transferencia (Vigro Holding Plus, Bioniche).

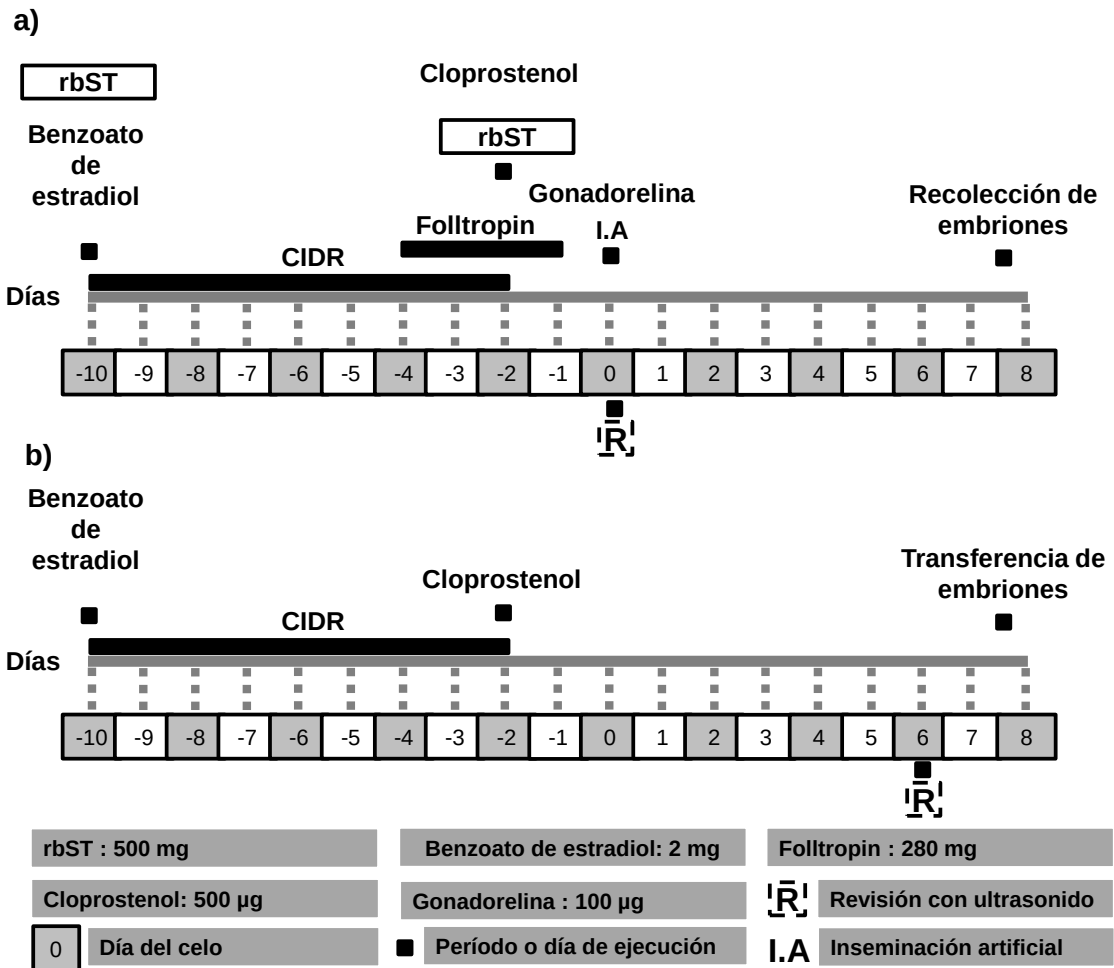


Figura 1. Protocolo de superestimulación en donadoras (a) y sincronización de celos en receptoras (b).

Posteriormente, las estructuras encontradas fueron evaluadas, bajo el lente del microscopio estereoscópico, considerando los estándares de desarrollo y calidad del manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (1998). Las receptoras recibieron un embrión de calidad 1 o 2 en el cuerno ipsilateral al CL. El diagnóstico de gestaciones se realizó a los 38 días después de haber recibido el embrión, mediante palpación rectal.

3.4.6 Variables de respuesta

Las variables de respuesta a los tratamientos fueron: a) diámetro del folículo preovulatorio más grande, b) respuesta ovulatoria, esta variable fue categorizada en varios niveles, de la siguiente manera: no respondió (la donadora no presentó celo o ≤ 2 CL), respuesta baja (3-5 CL), media (6-8 CL) y alta (≥ 9 CL), c) cantidad de ovocitos, d) cantidad de embriones degenerados d) cantidad de embriones transferibles y e) porcentaje de gestaciones en receptoras a los 38 días después de haber recibido el embrión. Además, se utilizó la información de la estación meteorológica URUZA, la cual pertenece a la red nacional de estaciones estatales agroclimáticas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, para la determinación del índice de temperatura y humedad (THI, por sus siglas en inglés) de acuerdo a la fórmula de Mader *et al.* (2006).

3.4.7 Análisis estadístico

La variable diámetro del folículo preovulatorio más grande fue analizada mediante una prueba de T a través del procedimiento PROC TTEST de SAS (SAS, 2004), 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 (una o dos aplicaciones de rbST) y ε_{ij} es el error experimental del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición.

Las variables respuesta ovulatoria y porcentaje de gestaciones en receptoras fueron analizadas mediante una prueba de X^2 usando el procedimiento PROC FREQ de SAS (SAS, 2004), bajo el siguiente modelo: $Y_{ij} = \phi + \phi T_i + \varepsilon_{ij}$

Donde ϕ es la frecuencia de la población, $\phi\tau_i$ es la frecuencia del efecto del i-ésimo tratamiento (una o dos aplicaciones de rbST) y ε_{ij} es el error experimental del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición.

Las variables número de ovocitos, número de embriones degenerados y transferibles fueron analizadas mediante una prueba de Wilcoxon, usando el procedimiento NPAR1WAY de SAS (SAS, 2004), 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 (una o dos aplicaciones de rbST) y ε_{ij} es el error experimental del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición. Los datos son presentados como medias $\pm$ error estándar y fueron consideradas significativas si $P \leq 0.05$.

3.5 Resultados y discusión

La presente investigación evaluó la aplicación de una contra dos dosis de somatotropina bovina recombinante sobre el diámetro del folículo preovulatorio más grande, respuesta ovulatoria y producción de embriones en vaquillas Holstein así como el porcentaje de gestaciones en vacas receptoras.

El experimento se llevó a cabo durante los meses calurosos de la región. Por tanto, es probable que las vaquillas hayan experimentado algún grado de estrés calórico. En estos meses, se obtuvo un índice de temperatura y humedad promedio de 74.4, lo cual, de acuerdo con Mader *et al.* (2006), puede ser un indicativo de condiciones de estrés por calor en el animal. La Figura 2 muestra el comportamiento del THI durante los días de los meses de julio y septiembre, en los cuales se llevaron a cabo los programas de transferencia de embriones. Sin embargo, tanto el promedio obtenido así como la información generada

para el mes de septiembre debe de tomarse con cautela, ya que debido a problemas que estuvieron fuera de nuestro control, no se pudo obtener la información meteorológica, para este mes, de la estación URUZA, por lo que se colectó la información únicamente de las 8 am a las 11 pm, por medio de un instrumento digital para la medición de temperatura y humedad relativa.

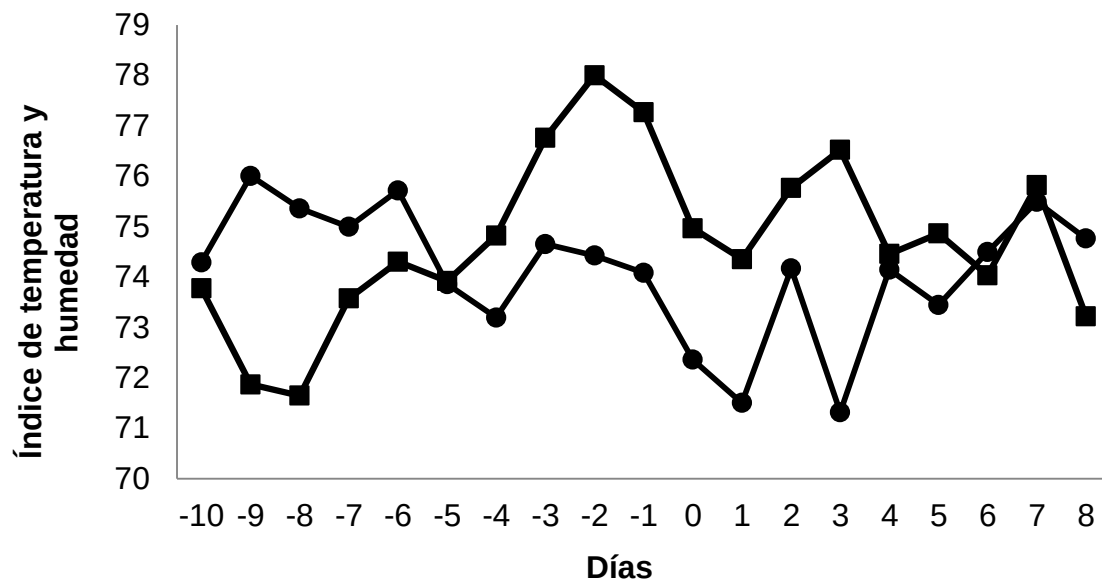


Figura 2. Índice de temperatura y humedad durante los meses de junio (líneas sólidas con círculos) y septiembre (líneas sólidas con cuadrados). El día cero representa el día del celo.

El diámetro del folículo preovulatorio más grande de las donadoras no fue diferente ($P>0.05$) entre ambos tratamientos (Cuadro 5). El diámetro del folículo preovulatorio afecta la calidad del ovocito ovulado y por consiguiente la probabilidad de que la hembra quede gestante después del servicio. Lo anterior, según Machatkova *et al.* (2004), es explicado por el nivel de competencia del ovocito (capacidad de completar su maduración, llevar a cabo la fertilización y alcanzar la etapa de blastocisto (Assidi *et al.*, 2008)), la cual es mayor en folículos de 11 a 15 mm de diámetro. En concordancia con esto último, algunos trabajos en vacas y vaquillas reportan que el diámetro óptimo del folículo

preovulatorio para incrementar la probabilidad de que la hembra quede gestante, es de 13 y 15.2 mm y ≥ 12.8 mm, respectivamente, pero tiende a reducirse cuando el diámetro es < 12.8 ó > 16 mm en vacas, y < 10.7 ó > 15.7 mm en vaquillas (Perry *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2012).

El diámetro del folículo de mayor tamaño en este estudio, para ambos grupos, coincide con el diámetro óptimo (≥ 12.8 mm) para lograr una gestación en vaquillas. Sin embargo, los porcentajes de gestaciones en receptoras fueron bajos (20% en ambos grupos, ($P > 0.05$), del total de receptoras solamente 15 recibieron un embrión, el resto fue retirado del experimento debido a que no respondieron a la sincronización o a problemas de salud, los embriones restantes fueron congelados). Lo anterior pudo deberse a tres factores, que pudieran haber afectado negativamente, solos o en conjunto, el desarrollo folicular y competencia del ovocito, estos son la superestimulación, estrés calórico y el uso de análogos de GnRH. La superestimulación implica el desarrollo de múltiples folículos, entonces al conocer el diámetro del folículo de mayor tamaño, es lógico pensar que el resto de los folículos presentan un diámetro menor y que la inducción de la ovulación de estos comprometería la calidad del ovocito. El segundo factor, lo hace a través de una disminución en la expresión de receptores a hormonas, actividad enzimática (Shimizu *et al.*, 2005) y viabilidad de las células (Roth *et al.*, 2001) involucradas en el desarrollo del folículo así como al alterar el proceso de maduración (Roth y Hansen, 2005) y reducir la competencia (Al-katani *et al.*, 2002) y calidad (Rocha *et al.*, 1998) del ovocito; mientras que el tercero lo hace al inducir la ovulación de folículos pequeños, ≤ 10.3 mm (Perry *et al.*, 2005). Por tanto, el bajo número de gestaciones obtenidas en las receptoras en este estudio pudo ser debido a la producción de ovocitos con una competencia reducida y a su vez de embriones incapaces de desarrollarse más allá del día 45, resultado de un posible efecto conjunto de la superestimulación, estrés calórico y el uso de análogos de

GnRH, al reducir el desarrollo folicular, competencia del ovocito y/o inducir la ovulación de folículos de menor tamaño al diámetro óptimo reportado.

La respuesta ovulatoria no fue afectada ($p > 0.05$) por la aplicación de una o dos dosis de rbST. Se superestimularon 20 vaquillas, de las cuales 19 de ellas presentaron algún nivel de respuesta ovulatoria (rbST-I, $47.37 \pm 16.6\%$ vs rbST-II, $52.63 \pm 15.8\%$). El Cuadro 4 muestra los resultados de la respuesta ovulatoria para los dos grupos evaluados en las diferentes categorías de respuesta ovulatoria estudiadas. No se encontraron diferencias por efecto de tratamiento en las tres categorías. Sin embargo, dentro de la categoría alta, el número de CL tiende a ser mayor en el grupo rbST-II (13.4 ± 2.5 CL vs 11.8 ± 0.8 CL).

Cuadro 4. Respuesta ovulatoria de vaquillas Holstein tratadas con una (rbST-I) o dos (rbST-II) dosis de 500 mg de rbST ((número de animales) porcentaje promedio $\pm$ error estándar).

Grupo	Nivel de respuesta		
	Baja (3-5 CL)	Media (6-8 CL)	Alta (≥ 9 CL)
rbST-I	(1) $33.3^a \pm 47.1$	(3) $50.0^b \pm 28.9$	(5) $50.0^c \pm 22.2$
rbST-II	(2) $66.7^a \pm 33.3$	(3) $50.0^b \pm 28.9$	(5) $50.0^c \pm 22.2$

Medias sin una letra en común, dentro de columnas son diferentes ($p \leq 0.05$).

La proporción de animales que respondieron al tratamiento superestimulador, es decir aquellos con una respuesta ovulatoria de categoría baja a alta, en este estudio (95%) es 6.5 y 7.5% superior a la reportada por los trabajos de Borges *et al.* (2001) y Moraes *et al.* (2008), respectivamente, en los cuales estuvo

involucrado el uso de rbST y 15.5% mayor que en el trabajo reportado por Sales *et al.* (2008), en donde no estuvo implicado el uso de la somatotropina. Sin embargo, el número de cuerpos lúteos obtenido en nuestro trabajo (rbST-I, 9.3 ± 1.1 vs rbST-II, 9.5 ± 1.5) es de un 36 a 144% menor a lo reportado en vaquillas por Gong *et al.* (1993b) y Kuehner *et al.* (1993) y en vacas por Herrier *et al.* (1994), cuando la somatotropina (dosis de 320 a 640 mg animal⁻¹) se aplicó cinco días antes o al inicio del período superestimulador. Los resultados de la literatura permiten presumir lo siguiente: el protocolo de superestimulación utilizado en este estudio fue efectivo en inducir una respuesta ovulatoria positiva en los animales tratados en ambos grupos. También, es factible suponer que la ausencia de diferencias significativas en la respuesta ovulatoria en el grupo rbST-II con respecto del -I se haya debido al tamaño de muestra utilizado, que al ser pequeño, impide establecer diferencias significativas entre los tratamientos. De igual forma, el menor número de cuerpos lúteos observado en ambos tratamientos, en comparación con otros estudios, en donde se aplicó la somatotropina, es probable que sea debido, no a un efecto de tratamiento, sino a diferencias en la fisiología reproductiva de las donadoras, tales como baja población folicular y/o reducida expresión de receptores a FSH en los folículos pequeños, que hayan impedido, cada uno o en conjunto, que se incrementara el número de folículos reclutados y seleccionados para su posterior desarrollo, ovulación y formación de cuerpos lúteos.

Los resultados de la producción de embriones por efecto del tratamiento de una o dos dosis de somatotropina se presentan en el Cuadro 5. La cantidad de ovocitos fue mayor ($P \leq 0.05$) en el grupo rbST-I, de las 19 superestimulaciones realizadas, 36.8% (seis en el grupo rbST-I y una en el rbST-II) de las donadoras produjeron al menos un ovocito. La cantidad de embriones degenerados tendió a incrementarse en el grupo rbST-II, sin diferencias significativas entre ambos grupos. El 36.8% de las donadoras produjeron embriones degenerados (tres del rbST-I y cuatro del rbST-II). La diferencia en producción de embriones transferibles entre ambos tratamientos tampoco fue significativa. Además,

solamente el 42.1% de las vaquillas produjeron embriones transferibles (cuatro del rbST-I y cuatro del rbST-II); y del total de embriones transferibles obtenidos el 63% fue producido por tres donadoras. Mientras que del 36.8% (dos del grupo rbST-I y cinco de rbST-II) de las vaquillas no se logró colectar ningún tipo de estructura (ovocito y/o embrión), a pesar de haber presentado una respuesta ovulatoria de categoría baja a alta.

La producción de ovocitos, de acuerdo a las cantidades mostradas en el Cuadro 5, en el grupo rbST-I es 6.5 veces mayor a lo obtenido en el grupo rbST-II. Sin embargo, debido a que de las 10 donadoras de este último grupo, del 50% de ellas no se colectó ninguna estructura, no sería apropiado hacer aseveraciones o suposiciones sobre el comportamiento de esta variable.

Cuadro 5. Medias $\pm$ error estándar del diámetro del folículo preovulatorio más grande, ovocitos, embriones degenerados y transferibles de vaquillas Holstein tratadas con una (rbST-I) o dos (rbST-II) dosis de 500 mg de rbST.

Variable	Grupo	
	rbST-I	rbST-II
Diámetro del folículo preovulatorio más grande (mm)	12.8 ± 0.8^a	12.9 ± 0.9^a
Ovocitos	1.3 ± 0.4^b	0.2 ± 0.2^c
Embriones degenerados	1.0 ± 0.5^d	4.5 ± 3.0^d
Embriones transferibles	1.0 ± 0.5^e	1.4 ± 0.7^e

Medias sin una letra en común, dentro de hileras son diferentes ($p \leq 0.05$).

La producción de embriones degenerados en el grupo rbST-II es 3.5 veces mayor que en el grupo rbST-I. A diferencia de la variable a la cual se hace referencia en el párrafo anterior, es factible suponer que de haberse obtenido embriones de las cinco vaquillas, de las cuales no se colectó ninguna estructura, seguirían un comportamiento similar para esta variable. Por consiguiente, es considerable sugerir un posible efecto del tamaño de la dosis usada en el grupo rbST-II. En general, dosis de rbST inferiores a 35.7 mg día⁻¹ tienen un efecto positivo sobre la reproducción animal (Erdman *et al.*, 1990; Bilby *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2010). Por tanto, es probable que el incremento en el número de embriones degenerados se deba a un efecto negativo de la alta dosis usada, 62.5 mg día⁻¹, en animales probablemente con alto grado de sensibilidad hacia la hormona, lo que generó condiciones anormales para la producción de un ovocito competente así como para el adecuado desarrollo del embrión, aun cuando Grings *et al.* (1990) reportaron que dosis de 41.2 mg día⁻¹ no comprometen la fertilidad de vaquillas.

Las dosis elevadas de rbST pueden afectar la calidad del ovocito y desarrollo embrionario de una forma directa o indirecta, a través de insulina y/o del Factor Análogo a Insulina tipo I (IGF-I). La primera, la puede realizar al inducir cambios que potencialmente pudieran afectar los mecanismos asociados con el mantenimiento de la gestación (Guzeloglu *et al.*, 2004), mientras que la segunda involucra en primera instancia, un incremento en las concentraciones tanto de IGF-I como de insulina, efecto predecible después de la aplicación de rbST (Kirby *et al.*, 1997; Bilby *et al.*, 2004; Settivari *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2010), por lo que es de esperarse que un incremento en la dosis de esta hormona aumente aún más las concentraciones de las dos primeras. Sin embargo, no se puede afirmar que esto sucedió en este estudio, ya que las concentraciones de dichas hormonas no fueron determinadas. Las altas concentraciones de IGF-I disminuyen la actividad de la enzima aromatasa estimulada por FSH (Bhatia y Price, 2001), y al igual que niveles elevados de insulina, ambos afectan negativamente la calidad del ovocito (Armstrong *et al.*,

2003; Adamiak *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2007). Además, elevadas concentraciones de IGF-I son capaces de inducir la muerte embrionaria temprana (Katagiri *et al.*, 1996 y 1997), al reducir el aporte de energía a la célula (Chi *et al.*, 2000). Lo anterior, puede ser potenciado por el efecto de la superestimulación ovárica, que puede ser amplificado por la somatotropina (Yoshimura *et al.*, 1994), al provocar un incremento en las concentraciones de IGF-I a través de los estrógenos (Richards *et al.*, 1991; Kuehner *et al.*, 1993; van Lier *et al.*, 2006).

La aplicación de dos dosis de somatotropina en vaquillas superestimuladas no produjo un efecto positivo sobre la producción de embriones transferibles, en esta investigación. Además, la cantidad de embriones transferibles, en ambos grupos, es de 1.8 a 8.2 veces inferior a lo reportado por otras investigaciones, en las cuales los animales recibieron una dosis de rbST (Rieger *et al.*, 1991; Kuehner *et al.*, 1993; Herrier *et al.*, 1994; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2004; Neves *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2008; Márquez, 2011). De igual forma, otros trabajos en donde no se utilizó somatotropina, pero sí semen sexado, reportan un número de embriones transferibles mayor al reportado en el Cuadro 5, (Hayakawa *et al.* (2009) y Peippo *et al.* (2009), 6.6, y Sartori *et al.* (2004), 2.3. Entonces, parece ser que nuestros resultados están por debajo de lo que se esperaría en un programa de transferencia de embriones y que la aplicación de dos dosis de rbST no tiene un efecto benéfico sobre la producción de embriones transferibles. Sin embargo, antes de hacer cualquier aseveración es importante considerar que de una proporción alta de donadoras, a pesar de presentar una respuesta ovulatoria, no se logró colectar ningún tipo de embrión u ovocito. Por tanto, no es posible afirmar sobre el efecto de la doble aplicación de rbST en la producción de embriones transferibles.

La no obtención de algún tipo de embrión u ovocito de animales superestimulados es un fenómeno que se puede presentar en mayor o menor

grado. En las investigaciones de Sartori *et al.* (2004) y Peippo *et al.* (2009), del 13 al 25% de los animales superestimulados producen una sola estructura o ninguna, tales porcentajes son inferiores a los encontrados en esta investigación.

El mecanismo responsable de este fenómeno aún permanece por ser dilucidado, es probable que el transporte de embriones de buena calidad sea diferente del de aquellos sin fertilizar o degenerados, los cuales son incapaces de llegar al útero para ser colectados (Sartori *et al.*, 2004). En mujeres con casos de infertilidad inexplicable, se ha encontrado que la causa probable es una incapacidad de la fimbria, debido a un tamaño insuficiente, para alcanzar el sitio de ovulación en el ovario, lo que impide que se colecte el ovocito (Ahmad-Thabet, 2000; Roy *et al.*, 2005). También, es probable que cuando se lleve a cabo la superestimulación, el ovario crezca considerablemente y su tamaño sobrepase la capacidad de la fimbria para abarcar todos los puntos de ovulación, ocasionando así la pérdida de ovocitos hacia la cavidad abdominal. Por tanto, se puede especular que alguno de los mecanismos antes mencionados pudo haber interferido con el transporte normal de ovocitos y/o embriones, lo que impidió su colección.

3.6 Conclusión

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la aplicación de dos dosis de somatotropina bovina recombinante en vaquillas Holstein superestimuladas, no influye sobre el diámetro del folículo preovulatorio más grande ni mejora la respuesta ovulatoria, en comparación con animales que recibieron una sola dosis. Sin embargo, la poca información obtenida sobre producción de embriones transferibles, impide que se emita un veredicto sobre la hipótesis de que dos dosis de somatotropina mejorarían la producción de

embriones transferibles, en comparación con una sola dosis en vaquillas superestimuladas.

3.7 Literatura citada

- Adamiak, S. J., K. Mackie, R. G. Watt, R. Webb, and K. D. Sinclair. 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biology of Reproduction* 73 (5): 918-926.
- Ahmad-Thabet, S. M. 2000. The fimbrio-ovarian relation and its role on ovum picking in unexplained infertility: the fimbrio-ovarian accessibility tests. *The Journal of Obstetrics and Gynecology Research* 26 (1): 65-70.
- Al-katani, Y. M., and P. J. Hansen. 2002. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of the heat shock protein 70 in embryonic development. *Molecular Reproduction and Development* 62 (2): 174-180.
- Armstrong, D. G., J. G. Gong, and R. Webb. 2003. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reproduction Supplement* 61: 403-414.
- Assidi, M., I. Dufort, A. Ali, M. Hamel, O. Algriany, S. Dielemann, and M. A. Sirard. 2008. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate *in vitro*. *Biology of Reproduction* 79 (2): 209-222.
- Bhatia, B., and C. A. Price. 2001. Insulin alters the effects of follicle stimulating hormone on aromatase in bovine granulosa cells in vitro. *Steroids* 66 (6): 511-519.
- 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 insulin-like growth factor system responses. *Journal of Dairy Science* 87 (10): 3256-3267.
- Borges, Á. M., C. A. Alves-Torres, J. R. Mendes-Ruas, V. R. Rocha-Júnior, e G. Ribeiro de Carvalho. 2001. Resposta superovulatória de novilhas mestiças holandês-zebu tratadas com somatotropina bovina recombinante (rbST). *Revista Brasileira de Zootecnia* 30 (5): 1439-1444.

- Chi, M. M., A. L. Schlein, and K. H. Moley. 2000. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-I receptor. *Endocrinology* 141 (12): 4784-4792.
- Chupin, D., and J. Saumande. 1979. New attempts to decrease the variability of ovarian response to PMSG in cattle. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 19 (5): 1489-1498.
- De la Sota, R. L., M. C. Lucy, C. R. Staples, and W. W. Thatcher. 1993. Effects of recombinant bovine somatotropin (Sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76 (4): 1002-1013.
- Demoustier, M. M., J. F. Beckers, P. Van Der Zwalmen, J. Closset, J. L. Gillard, and F. Ectors. 1988. Determination of porcine plasma follitropin level during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30 (2): 379-386.
- Erdman, R. A., B. K. Sharma, R. D. Shaver, and R. M. Cleale. 1990. Dose response to recombinant bovine somatotropin from weeks 15 to 44 postpartum in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 73 (10): 2907-2915.
- García, E. 1988. Modificaciones del Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México 4ª edición. 217 p.
- Gong, J. G., G. Baxter, T. A. Bramley, and R. Webb. 1997. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *Journal of Reproduction and Fertility* 110 (1): 91-97.
- 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 (3): 611-622.
- Gong, J. G., T. A. Bramley, and R. Webb. 1993a. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 97 (1): 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 (5): 1141-1149.
- Gonzalez-Fernandez, R., J. C. Velarde, F. Perea-Ganchou, E. Soto-Belloso, R. Palomares-Naveda, and H. J. Hernandez-Fonseca. 2004. Production of transferable embryos in Brahman cows treated with bovine somatotropin. *Reproduction, Fertility and Development* 16 (2): 210 (Abstract).
- Grings, E. E., D. M. de Avila, R. G. Eggert, and J. J. Reeves. 1990. Conception rate, growth, and lactation of dairy heifers treated with recombinant somatotropin. *Journal of Dairy Science* 73 (1): 73-77.

- Guzeloglu, A., T. R. Bilby, A. Meikle, S. Kamimura, A. Kowalski, F. Michel, L. A. MacLaren, and W. W. Thatcher. 2004. Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: II. Endometrial gene expression related to maintenance of pregnancy. *Journal of Dairy Science* 87 (10): 3268-3279.
- Hayakawa, H., T. Hirai, A. Takimoto, A. Ideta, and Y. Aoyagi. 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* 71(1): 68-73.
- Herrier, A., R. Einspanier, D. Schams, and H. Niemann. 1994. Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology* 41(3): 601-611.
- Katagiri, S., Y. S. Moon, and B. H. Yuen. 1996. The role for the uterine insulin-like growth factor I in early embryonic loss after superovulation in the rat. *Fertility and Sterility* 65 (2): 426-436.
- Katagiri, S., Y. S. Moon, and B. H. Yuen. 1997. A somatostatin analogue decreases embryonic loss following superovulation in rats by normalizing insulin-like growth factor-I action in the uterus. *Human Reproduction* 12 (4): 671-676.
- Kirby, C. J., M. F. Smith, D. H. Keisler, and M. C. Lucy. 1997. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-released bovine somatotropin. *Journal of Dairy Science* 80 (2): 273-285.
- 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 (5): 1003-1013.
- Lopes, A. S., S. T. Butler, R. O. Gilbert, and W. R. Butler. 2007. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 99 (1-2): 34-43.
- Lucy, M. C., J. C. Byatt, T. L. Curran, D. F. Curran, and R. J. Collier. 1994. Placental lactogen and somatotropin: hormone binding to the corpus luteum and effects on the growth and functions of the ovary in heifers. *Biology of Reproduction* 50 (5): 1136-1144.
- Machado, P. L. F., S. C. L. S. Bonilla, A. Schneider, E. Schmitt, and M. N. Correa. 2012. Effect of the ovulatory follicle diameter and progesterone concentration on the pregnancy rate of fixed-time inseminated lactating beef cows. *Revista Brasileira de Zootecnia* 41 (4): 1004-1008.

- Machatkova, M., K. Krausova, E. Jokesova, and M. Tomanek. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 61(2-3): 329-335.
- Mader, T. L., M. S. Davis, and T. Brown-Brandl. 2006. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 84: 712-719.
- Manual of the International Embryo Transfer Society. 1998. 3rd edition. International Society of Embryo Transfer, U.S.A. 172 p.
- Mapletoft, R. J., B. S. Kristina, and A. P. Gregg. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction, Nutrition, Development* 42 (6): 601-611.
- Márquez, H. C. I. 2011. Somatotropina bovina recombinante y viabilidad de embriones bovinos divididos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. México. 53 p.
- Moraes, F. J. J., J. R. de Souza-Torres Jr., I. Márcia-Nascimento, A. de Sousa Jr., H. Santos-Correia, A. Brito-Silva, R. J. Vieira, e J. A. Torres-Souza. 2008. Efeito da somatotropina recombinante bovina (rbST) na resposta ovulatória e na qualidade dos embriões de vacas Nelore. *Revista Científica de Produção Animal* 10 (2): 162-173.
- Neves, E. F., A. F. Ramos, e A. P. Marques Jr. 2005. Pré-tratamento com somatotropina bovina (rbST) na superovulação de doadoras da raça Holandesa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 57 (2): 205-209.
- Peippo, J., K. Vartia, K. Kananen-Anttila, M. Rätty, K. Korhonen, T. Hurme, Myllymäki, A. Sairanen, and A. Mäki-Tanila. 2009. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science* 111(1): 80-92.
- Perry, G. A., M. F. Smith, M. C. Lucy, J. A. Green, T. E. Parks, M. D. MacNeil, A. J. Roberts, and T. W. Geary. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (14): 5268-5273.
- Perry, G. A., M. F. Smith, A. J. Roberts, M. D. MacNeil, and T. W. Geary. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal of Animal Science* 85 (3): 684-689.
- Richards, M. W., R. P. Wettemann, L. J. Spicer, and G. L. Morgan. 1991. Nutritional anestrus in beef cows: effects of body condition and ovariectomy on serum luteinizing hormone and insulin-like growth factor I. *Biology of Reproduction* 44 (6): 961-966.

- Rieger, D., J. S. Walton, M. L. Goodwin, and W. H. Johnson. 1991. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 35 (5): 863-868.
- Rivera, F., C. Narciso, R. Olivera, R. L. A. Cerri, A. Correa-Calderon, R. C. Chebel, and J. E. P. Santos. 2010. Effect of bovine somatotropin (500 mg) administered at ten-day intervals on ovulatory responses, expression of estrus, and fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93 (4): 1500-1510.
- Rocha, A. R., D. Randel, J. R. Broussard, J. M. Lin, R. M. Blair, J. D. Roussel, R. A. Godke, and W. Hansel. 1998. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos Taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 49 (3): 657-665.
- Roth, Z., R. Median, A. Shaham-Albalancy, R. Braw-Tal, and D. Wolfenson. 2001. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 121(5): 745-751.
- Roth, Z., and P. J. Hansen. 2005. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Society of Reproduction and Fertility* 129 (2): 235-244.
- Roy, K. K., P. Hegde, K. Banerjee, N. Malhotra, B. Nayyar, D. Deka, and S. Kumar. 2005. Fimbrio-ovarian relationship in unexplained infertility. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 60 (3): 128-132.
- Sales, J. N. S., L. M. K. Dias, A. T. M. Viveiros, M. N. Pereira, and J.C. Souza. 2008. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with β -carotene and tocopherol. *Animal Reproduction Science* 106 (1-2): 77-89.
- Santos, J. E. P., R. L. A. Cerri, and R. Sartori. 2008. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology* 69 (1): 88-97.
- Santos, J. E. P., S. O. Juchem, R. L. A. Cerri, K. N. Galvao, R. C. Chevel, W. W. Thatcher, C. S. Dei, and C. R. Bilby. 2004. Effects of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87 (4): 868-881.
- Sartori, R., A. H. Souza, J. N. Guenther, D. Z. Caraviello, L. N. Geiger, J. L. Schenk, and M. C. Wiltbank. 2004. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Animal Reproduction* 1 (1): 86-90.
- SAS (Statistical Analysis System). 2004. SAS/AF[®] 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.

- Settivari, R. S., J. N. Spain, M. R. Eilersieck, J. C. Byatt, R. J. Collier, and D. E. Spiers. 2007. Relationship of thermal status to productivity in heat-stressed dairy cows given recombinant bovine somatotropin. *Journal of Dairy Science* 90 (3): 1265-1280.
- Shimizu, T., I. Ohshima, M. Ozawa, S. Takahashi, A. Tajima, M. Shiota, H. Miyazaki, and Y. Kanai. 2005. Heat stress diminished gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. *Reproduction* 129 (4): 463-472.
- Thomas, F. H., B. K. Campbell, D. G. Armstrong, and E. E. Telfer. 2007. Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development *in vitro*. *Reproduction* 133 (6): 1121-1128.
- van Lier, E., A. Meikle, H. Eriksson, and L. Sahlin. 2006. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and thioredoxin are differentially expressed along the reproductive tract of the ewe during the oestrous cycle and after ovariectomy. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1 (5): 1-8.
- Vasconcelos, L. V., D. F. C. Pereira, A. S. Rodrigues, M. Chalhoub, M. V. G. Loiola, P. A. Ferraz, B. H. A. Andrade, e A. L. Ribeiro-Filho. 2011. Resposta superovulatória e viabilidade de embriões de doadoras Nelore submetidas a pré-tratamento com Somatotropina Recombinante Bovina (rbST). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 12 (4): 1126-1136.
- Widayati, D. T. 2012. Embryo transfer as an assisted reproductive technology in farm animals. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 70: 369-372.
- Yoshimura, Y., M. Iwashita, M. Karube, T. Oda, M. Akiba, S. Shiokawa, M. Ando, A. Yoshinaga, and Y. Nakamura. 1994. Growth hormone stimulates follicular development by stimulating ovarian production of insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 135 (3): 887-894.