

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**EFFECTO DE EDAD DE LAS DONADORAS Y RECEPTORAS EN
UN PROGRAMA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
EN GANADO BOVINO**

T E S I S

Que como Requisito Parcial
para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias en Producción Animal



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
ORDEN DE EXAMENES PROFESIONALES

P R E S E N T A :

OSWALDO RODRIGUEZ GUTIERREZ

CHAPINGO, MEXICO

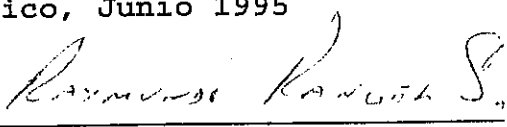
1995



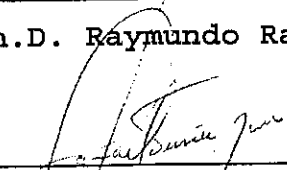
La presente tesis "Efecto de edad de las donadoras y receptoras en un programa de transferencia de embriones en ganado bovino", se realizó bajo la dirección del Ph. D. Raymundo Rangel Santos, y fue revisada y aceptada por el comité asesor y jurado examinador, como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Animal, con orientación en Reproducción.

Chapingo México, Junio 1995

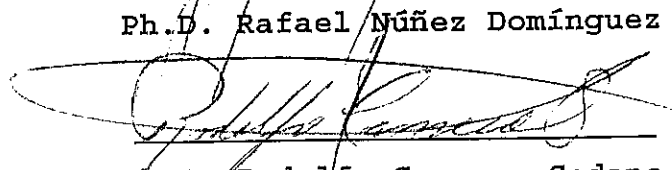
Presidente


Ph.D. Raymundo Rangel Santos

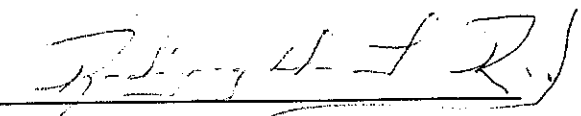
Asesor


Ph.D. Rafael Núñez Domínguez

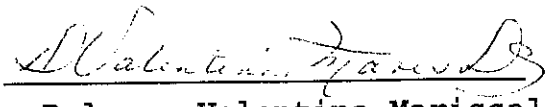
Asesor


Ph.D. Rodolfo Canseco Sedano

Representante de la Coordinación General de Estudios de Postgrado.


Ph.D. Raymundo Rodríguez de Lara

Representante de la Coordinación Departamental de Estudios de Postgrado.


Ph.D. Dolores Valentina Mariscal Aguayo

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Zootecnia por brindarme la oportunidad de estudiar la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero.

Al Ph.D. Raymundo Rangel Santos por las observaciones y atinada dirección del presente trabajo.

A los maestros miembros del jurado examinador: Ph.D. Raymundo Rangel Santos, Ph.D. Rafael Núñez Domínguez, Ph.D. Rodolfo Canseco Sedano, Ph.D. Raymundo Rodríguez de Lara, Ph.D. Dolores Valentina Mariscal Aguayo; por el tiempo y esfuerzo invertido para mejorar el presente trabajo.

Al C. José Hernández Espinoza y M.Sc. Alejandro Hernández de la Rosa, así como al personal administrativo y de campo de la hacienda Coronado, por el apoyo brindado en el trabajo de campo.

A mis amigos: Martín, René, Iván Héctor, Silvano, José, Justo; por su amistad.

Gracias a todos ellos

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Quirino y Alicia:

Por el apoyo y motivación que me han dado

A MIS HERMANOS:

Miguel Angel, Juan Manuel, Beatriz, Quirino y María Isabel

Por lo momentos gratos que compartieron conmigo.

A MIS SOBRINAS:

Elizabeth y Michelle

A ROSARIO:

Por el cariño, apoyo y comprensión que me proporcionó.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE APENDICES	vi
RESUMEN	viii
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	3
1. Desarrollo folicular	3
1.1. Durante el ciclo estral	3
1.2. Durante la superovulación	6
2. Transferencia de embriones	8
2.1. Selección de donadoras	8
2.2. Selección de receptoras	9
2.3. Superovulación	10
2.4. Sincronización de estro	13
2.5. Servicio a la donadora	15
2.6. Recolección de embriones	15
2.7. Evaluación de embriones	17
2.8. Transferencia de embriones	19
2.9. Preservación de embriones	20
3. Aplicaciones de la transferencia de embriones	25
4. Factores que afectan la respuesta superovulatoria	25
4.1. Edad	26
4.2. Concentración de progesterona	26
4.3. Genotipo	26
4.4. Nutrición	27
4.5. Gonadotropina	28
5. Factores que afectan la tasa de gestación	28
5.1. Embrionarios	29
5.2. Maternos	30
5.3. Ambientales	33
MATERIALES Y METODOS	36
EXPERIMENTO I	36
1. Localización	36
2. Manejo de los animales	36
3. Donadoras	37
4. Sincronización del estro	37
5. Superovulación	37
6. Recolección de embriones	38
7. Evaluación de embriones	38
8. Preservación de embriones	39
9. Análisis estadístico	40

EXPERIMENTO II	40
1. Localización	41
2. Manejo de los animales	41
3. Donadoras	42
4. Selección de receptoras	42
5. Superovulación	43
6. Sincronización de estro	43
7. Recolección de embriones	44
8. Evaluación de embriones	44
9. Transferencia de embriones	44
10. Preservación de embriones	44
11. Toma de muestras de sangre	45
12. Análisis estadístico	45
EXPERIMENTO III	45
1. Donadoras	45
2. Receptoras	45
3. Superovulación	46
4. Sincronización de estro... ..	46
5. Recolección de embriones	46
6. Transferencia de embriones	47
7. Análisis estadístico	47
RESULTADOS	48
EXPERIMENTO I	48
a) Incidencia y distribución de la frecuencia del estro ...	48
b) Efecto de edad sobre respuesta superovulatoria	48
c) Efecto de la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la respuesta ovulatoria.....	50
EXPERIMENTO II	52
a) Efecto de edad sobre la incidencia y distribución de la frecuencia del estro	52
b) Respuesta superovulatoria	54
c) Efecto de edad sobre la tasa de gestación	54
d) Concentración de progesterona en suero sanguíneo	55
EXPERIMENTO III	57
a) Efecto de edad sobre la incidencia y distribución de la frecuencia del estro	57
b) Efecto de edad sobre la respuesta superovulatoria	58
c) Efecto de edad sobre la tasa de gestación	60
d) Concentración de progesterona en suero sanguíneo	60

DISCUSION	63
SINCRONIZACION DEL ESTRO	63
EXPERIMENTO I	63
EXPERIMENTO II	64
EXPERIMENTO III	65
RESPUESTA SUPEROVULATORIA	66
Efecto de edad	66
Presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio	67
Presencia de un folículo dominante el día 10 del ciclo estral	68
Concentración de progesterona	69
Recuperación de embriones	70
EFECTO DE EDAD SOBRE LA TASA DE GESTACION	71
RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE PROGESTERONA EN SUERO AL MOMENTO DE LA TRANSFERENCIA Y LA TASA DE GESTACION	72
CONCLUSIONES	74
LITERATURA CITADA	75
APENDICE	94

LISTA DE CUADROS

Cuadro No.

1	Edad estimada en días para cada estadio de desarrollo.....	18
2	Tasas de enfriamiento usadas en la congelación de embriones bovinos.....	23
3	Producción media de embriones por raza de donadora a la primera colección.....	27
4	Tasas de gestación producidas por embriones de distinta calidad.....	30
5	Tratamiento superovulatorio utilizado.....	42
6	Efecto de edad sobre la tasa ovulatoria (Experimento I).....	49
7	Efecto de edad sobre la producción de embriones (Experimento I).....	49
8	Efecto de la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la tasa ovulatoria (Experimento I).....	50
9	Efecto de la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la producción de embriones (Experimento I).....	51
10	Efecto de la presencia de un folículo dominante el día 10 del ciclo estral, durante dos ciclos inducidos (Ciclos 1 y 2) y al inicio del tratamiento superovulatorio (Ciclo 3), sobre la tasa ovulatoria (Experimento I).....	52
11	Efecto de edad sobre la probabilidad de incidencia del estro en las tres aplicaciones de Prostaglandina (Experimento II).....	53
12	Efecto de edad sobre la distribución de la frecuencia del estro (Experimento II).....	54
13	Efecto de edad sobre la tasa de gestación de vacas receptoras de embriones (Experimento II).....	55

14	Efecto de la concentración de progesterona en suero al momento de la transferencia sobre la tasa de gestación (Experimento II).....	56
15	Concentración de progesterona el día del tratamiento superovulatorio y el día de la recolección de embriones (Experimento II).....	57
16	Efecto de edad sobre la incidencia del estro (Experimento III).....	58
17	Efecto de edad sobre la tasa ovulatoria (Experimento III).....	59
18	Efecto de edad sobre la producción de embriones (Experimento III).....	59
19	Efecto de edad sobre la tasa de gestación de vacas receptoras de embriones (Experimento III).....	60
20	Efecto de la concentración de progesterona al momento de la transferencia sobre la tasa de gestación (Experimento III).....	61
21	Efecto de la concentración de progesterona el día del tratamiento superovulatorio y el día de la recolección de embriones sobre la tasa ovulatoria (Experimento III).....	62

LISTA DE APENDICES

Apéndice No.

1	Prueba de Barttlet de homogeneidad de varianzas para el experimento I.....	94
2	Prueba de Barttlet de homogeneidad de varianzas para en el experimento III.....	95
3	Análisis de varianza para el efecto de edad sobre la producción de embriones totales en el experimento I.....	95
4	Análisis de varianza para el efecto de edad sobre tasa ovulatoria en el experimento I.....	96
5	Análisis de varianza para el efecto de edad sobre la producción de embriones transferibles en el experimento V.....	96
6	Análisis de varianza para el efecto de edad sobre tasa de recuperación de embriones en el experimento I.....	97
7	Tabla de contingencia para la respuesta a la primera aplicación de Prostaglandina en el experimento II.....	97
8	Tabla de contingencia para la respuesta a la segunda aplicación de Prostaglandina en el experimento II.....	97
9	Tabla de contingencia para la respuesta a la tercera aplicación de Prostaglandina en el experimento II.....	98
10	Tabla de contingencia para el efecto de edad sobre tasa de gestación en el experimento II.....	98
11	Tabla de contingencia para la concentración de progesterona sobre la tasa de gestación en el experimento II.....	99
12	Tabla de contingencia para el efecto de edad sobre la respuesta al implante de Norgestomet en el experimento III.....	99

13	Análisis de varianza para el efecto de edad sobre la producción de embriones totales en el experimento III.....	100
14	Análisis de varianza para el efecto de edad sobre la tasa ovulatoria en el experimento III.....	100
15	Análisis de varianza para el efecto de edad sobre la producción de embriones transferibles en el experimento III.....	101
16	Análisis de varianza para el efecto de edad sobre la tasa de recuperación de embriones en el experimento III.....	101
17	Tabla de contingencia para el efecto de edad sobre la tasa de gestación en el experimento III.....	102
18	Tabla de contingencia para la concentración de progesterona y tasa de gestación en el experimento III.....	102
19	Análisis de varianza para el efecto de un folículo dominante sobre la producción de embriones totales en el experimento I.....	103
20	Análisis de varianza para el efecto de un folículo dominante sobre la tasa ovulatoria en el experimento I.....	103
21	Análisis de varianza para el efecto de un folículo dominante sobre la producción de embriones transferibles en el experimento I...	104
22	Correlación entre la concentración de progesterona y la tasa ovulatoria en el experimento II.....	104

RESUMEN

EFFECTO DE EDAD DE LAS DONADORAS Y RECEPTORAS EN UN PROGRAMA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN GANADO BOVINO

*Oswaldo Rodríguez Gutiérrez, M. C. en Producción animal
Universidad Autónoma Chapingo, 1995
Director de tesis: Raymundo Rangel Santos, Ph. D.*

Los objetivos del presente estudio fueron: (1) determinar el efecto de edad de la donadora, la presencia de un folículo dominante y la concentración de progesterona (P) en suero al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio, sobre la respuesta superovulatoria; y (2) estudiar el efecto de la edad de la receptora y la concentración de P en suero el día de la transferencia sobre la tasa de gestación. Se llevaron a cabo 3 experimentos. El experimento I se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Chapingo. Se utilizaron 10 animales (6 adultos y 4 jóvenes) Angus x Pardo Suizo y Simmental x (Angus x Pardo Suizo). La sincronización del estro se realizó mediante la aplicación de dos dosis de 15 mg de Luprostiol (Prosolvín, Intervet) con un intervalo de 11 días entre una y otra, y un implante de Norgestomet (Crestar, Intervet) por 9 días. La superovulación fue mediante la aplicación de 2,500 U.I. de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG; Folligon, Intervet), dos días antes de la remoción del implante. Los ovarios fueron revisados por ultrasonografía al momento de la aplicación del PMSG. La recolección de embriones se realizó el día 7 del ciclo estral (estro = día 0), mediante el método no quirúrgico, los embriones fueron congelados por el método manual.

El experimento II se llevó a cabo en Venado, S.L.P. La sincronización del estro fue realizada mediante la aplicación de dos dosis de 15 mg de Luprostiol con un intervalo de 10 días entre una y otra. La superovulación se realizó con 18 mg de FSH (Folltropin, VetrepHarm) en cuatro animales de la raza Limousin, iniciando el día 10 del ciclo estral. La recolección de embriones se llevó a cabo el día 7 del ciclo estral por el método no quirúrgico. La transferencia de embriones se realizó por el método no quirúrgico a 16 receptoras (8 jóvenes y 8 adultas). Se tomaron muestras de sangre a las donadoras al momento de iniciar el tratamiento de superovulación y al recolectar los embriones y a las receptoras el día de la transferencia con el fin de determinar la concentración de progesterona (Pr).

El experimento III fue similar al experimento II excepto que en éste la sincronización del estro se realizó mediante la aplicación de un implante de Norgestomet por 10 días para donadoras y 9 días para receptoras. Se aplicó un pretratamiento con 2.5 ml de

Folltropin los días 3 y 4 del ciclo estral. Los animales utilizados fueron 8 donadoras (4 jóvenes y 4 adultas) y 26 receptoras (14 jóvenes y 12 adultas).

La edad de la donadora no tuvo efecto ($P > 0.05$) sobre la respuesta a la superovulación. La presencia de un folículo dominante al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio tuvo un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la producción de embriones totales y embriones transferibles, pero no sobre la tasa ovulatoria. La concentración de Pr al inicio del tratamiento superovulatorio no tuvo relación ($P > 0.05$) con la tasa ovulatoria.

La tasa de gestación fue similar entre animales adultos y jóvenes. La concentración de P al momento de la transferencia fue semejante entre los animales que quedaron gestantes y vacíos.

Se concluye que la edad y la concentración de Pr al inicio del tratamiento superovulatorio no afectan la respuesta a la superovulación. La presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio provoca una disminución en la producción de embriones totales (2.6 vs. 4.6) y embriones transferibles (0.5 vs. 3.2). La concentración de Pr el día de la transferencia no afectó la tasa de gestación. La edad de la receptora no tuvo efecto sobre la tasa de gestación, sin embargo, se observó un mejor comportamiento de los animales jóvenes.

SUMMARY

EFFECT OF AGE OF DONORS AND RECIPIENTS IN AN EMBRYO TRANSFER PROGRAMME IN CATTLE

Oswaldo Rodriguez Gutierrez, M.S. Animal Science
Universidad Autonoma Chapingo, 1995
Raymundo Rangel Santos, Ph D. Asesor.

The objectives of the study were: (1) : To evaluate the effect of age of the donor, the presence of a large follicle and the concentration of progesterone (P) in serum at the beginning of the superovulatory treatment on ovulation rate; and (2) To study the effect of age of the recipient and the concentration of P in serum the day of transfer on pregnancy rate. Three studies were carried out. The first experiment was conducted at Universidad Autonoma Chapingo. Ten cows were used (6 multiparous and 4 primiparous) Angus x Brown Swiss and Simmental x (Angus x Brown Swiss). The oestrus was synchronized with two injections of 15 mg of Luprostiol (Prosolvin, Intervet) at 11 days between them, and a Norgestomet implant (Crestar, Intervet) inserted for 9 days. The animals were superovulated with 2500 IU of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG; Folligon, Intervet) administered two days before implant removal. The ovaries were evaluated with an ultrasound B mode equipment at the time of PMSG administration. Embryo collection was conducted 7 days after oestrus (oestrus = day 0), through a non-surgical method. The embryos were frozen using a manual procedures.

The second experiment was conducted at Venado, S.L.P. The oestrus was synchronized using two injection of 15 mg of Luprostiol administered at 19 days interval. Four Limousin cows were superovulated with 18 mg of FSH (Folltropin, Vetrepahrm), starting the treatment on day 19 of the oestrous cycle. Embryo flushing was conducted 7 days after oestrus onset using a nonsurgical method. Embryo transfer by a non-surgical method was conducted on sixteen recipients (8 multiparous and 8 primiparous). Blood was collected from the donors at the beginning of the superovulatory treatment and at embryo flushing and from the recipients the day of embryo transfer to determine the concentration of progesterone.

The third experiment was similar to experiment two, but in the third the oestrus was synchronized using a Norgestomet implant for 10 days in donors and 9 days in recipients. The animals also received 2.5 ml of Folltropin on day 3 and 4 of the cycle. The animals used were 8 donors (4 multiparous and 4 primiparous) and 26 recipients (14 primiparous and 12 multiparous).

There was no significant effect ($P > 0.05$) of age of the donor on the superovulatory response. There was a significant effect ($P < 0.05$) of the presence of a large follicle at the beginning of the superovulatory treatment on the total number of embryos and the total number of transferable embryos, but not on ovulation rate. There was no significant ($P > 0.05$) relationship between concentration of P and ovulation rate. Pregnancy rate was similar in multiparous and primiparous recipients. The concentration of P at the time of embryo transfer was similar in pregnant and non-pregnant recipients.

In conclusion age and level of P at the beginning of the superovulatory treatment did not affect the response to the treatment. The incidence of a large follicle at the beginning of the treatment decreased the total number of embryos (2.6 vs 4.6) and the number of transferable embryos (0.5 vs 3.2). The concentration of P on the day of transfer did not affect pregnancy rate. The age of the recipient did not affect pregnancy rate, however, primiparous cows showed better responses.

INTRODUCCION

El sistema de producción de carne normalmente se lleva a cabo en condiciones extensivas, los becerros son destetados a los seis meses de edad o más, al término de los cuales pueden ser engordados en pastoreo o en corrales.

La carne de bovino en nuestro país, tiene una gran importancia debido a que representa uno de los principales aportes de proteína de origen animal a la dieta (16.4 Kg/hab/año; C.N.G., 1993).

Los niveles de producción de carne bovina son bajos lo cual se debe a diversos factores, tales como la baja calidad genética de los animales. Dentro de las herramientas utilizadas para el mejoramiento genético, se encuentran algunas técnicas reproductivas como son la inseminación artificial y la transferencia de embriones.

En las últimas décadas, la inseminación artificial permitió un progreso genético relativamente rápido a través del uso extensivo de semen congelado obtenido de sementales con pruebas de progenie favorables. Sin embargo, la rapidez de este progreso genético se ve limitado por la contribución genética de la hembra pues sólo produce un becerro por año. Actualmente, con la técnica de transferencia de embriones, se puede lograr un mayor progreso genético, dado que una hembra tiene la capacidad de producir varios becerros por año (Curtis, 1990).

La aplicación práctica de la transferencia de embriones tiene dos partes críticas, la respuesta ovulatoria a los tratamientos de superovulación y la tasa de gestación posterior a la transferencia (Thibier y Nibart, 1992).

La respuesta ovulatoria es muy variable y es influenciada por diferentes factores, dentro de los cuales se han identificado el estado del ciclo estral al momento de iniciar el tratamiento, la edad de la donadora, el nivel de progesterona en suero al momento de iniciar el tratamiento, así como la gonadotropina utilizada.

La tasa de gestación depende de la calidad del embrión transferido así como de la calidad de la receptora utilizada. Si se considera la disponibilidad de un embrión de buena calidad y un técnico experimentado, la receptora es la que determina el éxito de la transferencia. Algunos de los factores que afectan la tasa de gestación incluyen el grado de sincronización entre donadora y receptora, la edad de la receptora y la concentración de progesterona al momento de la transferencia.

Con el fin de obtener información que coadyuve a la implementación práctica de la transferencia de embriones se plantea el presente trabajo que tiene como objetivos, determinar:

1. El efecto de la edad de la donadora sobre la respuesta ovulatoria.
2. El efecto de la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la respuesta ovulatoria.
3. La relación entre la concentración de progesterona en suero al momento del inicio del tratamiento superovulatorio y la respuesta ovulatoria.
4. El efecto de la edad de la receptora sobre la tasa de gestación.
5. La relación entre la concentración de progesterona en suero de la receptora al momento de la transferencia y la tasa de gestación.

REVISION DE LITERATURA

1. Desarrollo Folicular.

El estudio del desarrollo de los folículos ováricos es uno de los aspectos más importantes de la fisiología de la reproducción. El objetivo final es el entendimiento de las interacciones celulares y hormonales, involucradas en el desarrollo exitoso de folículos ovulatorios. La complejidad de este proceso deriva parcialmente de su alta selectividad, pues en los mamíferos, menos del 1% de los folículos presentes en el ovario completan su maduración y ovulan, mientras que más del 99% sufren atresia (Sirois y Fortune, 1990).

1.1. Durante el ciclo estral.

La foliculogénesis en el bovino puede ser dividida en dos partes en base a los requerimientos de gonadotropinas por los folículos: foliculogénesis basal, la cual puede llevarse a cabo al menos parcialmente en ausencia de gonadotropinas y una foliculogénesis tónica, que requiere gonadotropinas. La foliculogénesis tónica inicia cuando los folículos alcanzan alrededor de 4mm (Driancourt, 1991).

El crecimiento de los folículos ováricos en el bovino ocurre en forma de oleadas u ondas foliculares, las cuales pueden ser dos o tres a lo largo del ciclo (Ireland y Roche, 1986; Sirois y Fortune, 1990; Driancourt, 1991; Savio et al., 1993).

La razón por la cual algunas vacas tienen dos oleadas foliculares, mientras que otras tienen tres no es muy clara. Sin embargo, existen diferencias entre ambas (Ginther et al., 1989c; Sirois y Fortune, 1990).

Las vacas con dos oleadas foliculares tienen ciclo estral y fase luteal más cortos que las vacas con tres oleadas. El folículo dominante de la primera oleada alcanza un tamaño grande, lo cual ocasiona un retardo en la aparición de la segunda oleada (Sirois y Fortune, 1990).

La oleada folicular esta constituida por tres etapas, reclutamiento, selección y dominancia (Ireland y Roche 1987; Sirois y Fortune, 1990; Driancourt, 1991; Savio et al., 1993). Posiblemente esten involucradas señales endócrinas, parácrinas y autócrinas (Driancourt, 1991).

1.1.1. Reclutamiento.

El reclutamiento es la entrada de los folículos a un estado dependiente de gonadotropinas, se caracteriza por la agrupación de folículos que marcan el inicio de la oleada folicular (Sirois y Fortune, 1990; Driancourt, 1991).

La hormona folículo estimulante (FSH) es la señal clave para el reclutamiento y no se ha encontrado ningún efecto de la hormona luteinizante (LH). Esta señal para el reclutamiento, parece ser modulada localmente a través de factores de crecimiento, principalmente a través de la acción autócrina del factor de crecimiento epidermal (EGF) (Driancourt, 1991).

1.1.2. Selección.

Durante esta fase muchos folículos inician su desarrollo, pero sufren atresia y solo uno emerge del lote reclutado (folículo dominante) (Ireland y Roche, 1986).

La Selección puede lograrse mediante dos rutas:

- a) Ruta pasiva.- Donde el folículo más maduro inhibe indirectamente el crecimiento de los folículos menos maduros, por una reducción de la concentración de FSH por abajo del nivel necesario (tres veces el nivel basal) para mantener otros folículos.
- b) Ruta activa.- El folículo maduro inhibe directamente el crecimiento de los folículos menos maduros a través de la secreción a la sangre de algunas sustancias que reducen su sensibilidad a FSH (Driancourt, 1991; Adams et al., 1992).

1.1.3. Dominancia.

El folículo dominante desarrollado en la fase de selección inhibe el crecimiento de los folículos subordinados mediante la secreción de hormonas como: estradiol, proteína reguladora folicular, inhibina, activina, folistatina y algunos factores promotores o inhibidores del crecimiento, los cuales pueden actuar local, sistémicamente o de ambas formas (Ireland y Roche, 1986; Driancourt, 1991; Dereck y Dorrington, 1992; Savio et al., 1993).

El mantenimiento del folículo dominante mientras el resto de los folículos sufre atresia, podría estar relacionado con una estimulación autócrina del folículo dominante a través del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I; Driancourt, 1991). El primer folículo dominante puede ser identificado usando ultrasonografía entre los días 2 y 4 del ciclo y alcanza su diámetro máximo entre los días 6 y 8, manteniendo su tamaño por unos días y sufre atresia luego de la aparición de la segunda oleada folicular alrededor de la mitad del ciclo (Driancourt, 1991; Savio et al., 1993).

Si la regresión del cuerpo lúteo coincide con la fase de dominancia, el folículo dominante ovulará, si no es así el folículo sufre atresia (Ireland y Roche, 1986). Esto último a causa de la falta de secreción de LH por la hipófisis, debido a la retroalimentación negativa que ejerce la progesterona secretada por el cuerpo lúteo (Savio *et al.*, 1993).

El folículo debe tener un tamaño aproximado de al menos 3-4 mm en el momento de la regresión del cuerpo lúteo, para tener oportunidad de ovular (Driancourt, 1991).

1.2. Durante la superovulación.

Uno de los factores limitantes más importantes de la aplicación de la transferencia de embriones es la ausencia de una respuesta ovulatoria predecible, lo cual se debe a diferentes factores (Boland *et al.*, 1991).

Un entendimiento detallado de los procesos involucrados en el crecimiento y diferenciación de los folículos ovulatorios es un prerequisite, para el desarrollo de nuevas técnicas o el mejoramiento de los ya existentes regímenes de superovulación (Driancourt, 1991), los cuales son importantes para el éxito de la transferencia de embriones (Ireland y Roche, 1986; Sirois y Fortune, 1990).

Los folículos dominantes están presentes entre los días 4-6, 12-14 y durante la fase folicular del ciclo (Boland *et al.*, 1991). La mayoría de los trabajos de superovulación se llevan a cabo durante la mitad de la fase luteal del ciclo, con la administración de gonadotropinas el día 10, esto debería coincidir con la presencia de un folículo dominante activo (Boland *et al.*, 1991).

La presencia de un folículo dominante al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio, tiene efectos negativos en la respuesta ovulatoria (Grasso et al., 1989; Sirois y Fortune 1990; Boland et al., 1991; Hahn, 1992).

El número de folículos pequeños al inicio del tratamiento superovulatorio está correlacionado con la respuesta superovulatoria, pues la presencia de más de 7 folículos pequeños (3-6 mm de diámetro) al momento de iniciar la superovulación, producen más embriones que aquellos ovarios con menos de 3 folículos (Romero et al., 1991). Mientras que los folículos de 7-10 y >10 mm limitan el reclutamiento de folículos de 2-3 mm durante el tratamiento superovulatorio (Guilbault et al., 1988)

La presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio, retarda la aparición y reduce el número de folículos >7 mm durante el tratamiento superovulatorio, lo cual es asociado con la reducción en el número de ovulaciones (Grasso et al., 1989).

El inicio del tratamiento superovulatorio en la fase temprana del ciclo (día 2 ó 3) produce una respuesta menor tanto en ovulaciones como en la producción de embriones transferibles, cuando se compara con el inicio a la mitad del ciclo. Aún cuando no existe un folículo dominante en el día 2, el ovario no es capaz de responder a la estimulación en esta fase con un número grande de embriones (Boland et al., 1991). Esto se debe quizá a la cantidad y/o calidad de las variaciones cíclicas en la población de folículos capaces de responder a gonadotropinas (Lindsell et al., 1986).

La inducción de la superovulación al momento de la atresia del folículo dominante produce mejores resultados. En un estudio

donde el folículo dominante fue roto y la superovulación se inició un día después se obtuvieron 12.3 y 7.5 embriones totales, 9.3 y 3.6 embriones transferibles, para los animales tratados y el grupo testigo, respectivamente (Hahn, 1992).

2. Transferencia de embriones.

La transferencia de embriones es una técnica especializada donde una hembra sexualmente apta denominada donadora, es inyectada con hormonas exógenas para producir más óvulos, los cuales son fertilizados ya sea por monta natural o inseminación artificial, removidos antes de su implantación y transferidos al tracto reproductivo de hembras sincronizadas de la misma especie, denominadas receptoras, donde se desarrollarán hasta el término de la gestación (Jillella, 1982; Curtis, 1990).

La técnica de transferencia de embriones consiste en los siguientes pasos: selección y manejo de donadoras y receptoras, sincronización de estros entre la donadora y receptoras, servicio de la donadora, colección de embriones, evaluación y almacenamiento de embriones y transferencia de los mismos (Jillella, 1982; Curtis, 1990). Un error en alguno de los pasos probablemente resultaría en tasas de gestación bajas (Jillella, 1982).

2.1. Selección de donadoras.

La selección de donadoras se basa en la superioridad genética y eficiencia reproductiva y depende del objetivo de la explotación (Seidel y Elsdén, 1989). En ganado lechero se puede usar el registro de producción y prueba de progenie del padre de la vaca; en ganado productor de carne se puede considerar, calidad de canal, tasa de crecimiento pre y postdestete, aptitud

lechera, etc. En razas de reciente introducción, una hembra de conformación sana y habilidad reproductiva puede ser donadora. La edad de la donadora es un factor importante, sin embargo, vacas de dos o tres partos son preferibles que vacas viejas (Jillella, 1982; Seidel y Elsdén, 1989).

La habilidad reproductiva de las posibles donadoras debe tomarse muy en cuenta. Los aspectos más importantes a considerar son los siguientes:

- 1) Los servicios por concepción deben variar entre uno y dos.
- 2) Los partos deben haber sido normales y regulares cada año.
- 3) Los ciclos estrales deben ser regulares.
- 6) Libre de enfermedades como: Brucelosis, Tuberculosis, Leptospirosis, Lengua azul, Anaplasmosis, Vibriosis, Tricomonirosis, etc. (Church y Shea, 1976; Jillella, 1982; Greve, 1986; Seidel y Elsdén, 1989).

2.2. Selección de receptoras.

Las receptoras frecuentemente provienen de grupos de animales mal manejados y presentan algunos problemas nutricionales e infecciosos (Greve, 1986; Seidel y Elsdén, 1989). Es necesario señalar que receptoras con esas características siempre producen bajas tasas de gestación (Greve, 1986).

El tamaño de las receptoras es un factor importante, especialmente si la donadora es de una raza productora de carne tal como la Charolais. Por lo tanto, vacas con buena talla corporal y mayor amplitud pélvica, deberían ser seleccionadas, para evitar problemas de distocia, además de que producirán becerros más grandes al nacimiento (Jillella, 1982; Seidel y Elsdén, 1989).

El estado reproductivo también debe considerarse, tomando en cuenta los mismos aspectos que para la donadora, de manera que deben estar reproductivamente sanas y vacías (Jillella, 1982; Seidel y Elsdén, 1989; Thibier y Nibart, 1992).

El uso de vacas o vaquillas como receptoras tiene ventajas y desventajas y la elección debe ser hecha para las condiciones de cada caso (Broadbent et al., 1991).

La vaca tiene menos problemas al parto, pero las vaquillas tienen una mayor facilidad de manejo debido a que no están lactando, no requieren ordeña ni manejo del becerro, además de que generalmente tienen una mayor fertilidad, especialmente en ganado lechero (Broadbent et al., 1991).

La transferencia no quirúrgica es más difícil en vaquillas que en vacas (Broadbent et al., 1991; Seidel y Moore, 1991).

La condición corporal y el estado de salud, también deben tomarse en cuenta (Seidel y Elsdén, 1989; Broadbent et al., 1991; Seidel y Moore, 1991; Thibier y Nibart, 1992).

2.3. Superovulación.

La superovulación es definida como el tratamiento de la hembra con hormonas exógenas para que sean ovulados más ovocitos que en condiciones normales (Jillella, 1982; Seidel y Elsdén, 1989; Curtis, 1990; Seidel y Moore, 1991). Los tratamientos superovulatorios normalmente resultan en 10 ovulaciones, de las cuales cinco o seis son recuperadas como embriones normales (Seidel y Elsdén, 1989; Curtis, 1990; Seidel y Moore, 1991). Sin embargo, existe una amplia variación en el número de ovulaciones por vaca (Seidel y Elsdén, 1989). En general un 85 % de las

donadoras responden al tratamiento superovulatorio, el cual puede repetirse a intervalos de 60 días con una ligera disminución en la producción de embriones cada vez (Curtis, 1990).

Al momento del nacimiento una hembra bovina contiene alrededor de 200 000 ovocitos en ambos ovarios (Seidel y Elsdén, 1989).

Como se mencionó antes, el crecimiento folicular durante el ciclo estral incluye tres etapas: reclutamiento, selección y dominancia (Driancourt, 1991). En el bovino existen dos o tres oleadas de crecimiento folicular para cada ciclo estral (Ireland y Roche, 1986; Fogwell, 1988; Ginther et al., 1989c), que culminan con un folículo grande (dominante). El folículo dominante inhibe el crecimiento de los folículos pequeños, a través de la secreción de estradiol e inhibina (Ireland y Roche, 1986; Fogwell, 1988; Ghinter et al., 1989a; Driancourt, 1991). El folículo dominante puede ovular o sufrir atresia, lo que depende de la concentración de progesterona al momento de su maduración. Si el folículo alcanza la maduración cuando la concentración de progesterona no ha disminuido sufre atresia, mientras que si su maduración coincide cuando declina la progesterona, completa su maduración y ovula (Ireland y Roche, 1986; Seidel y Elsdén, 1989).

La foliculogénesis es controlada por la interacción de dos hormonas, la hormona folículo estimulante (FSH), secretada por la glándula pituitaria, que causa el crecimiento rápido de los folículos durante los cuatro o cinco días antes de la ovulación (Seidel y Moore, 1991), y la inhibina, que es sintetizada y secretada a la sangre por las células de la granulosa y su función es la de evitar la secreción de FSH por la glándula pituitaria (Demoulin et al., 1986).

El estado folicular de los ovarios antes de iniciar el tratamiento superovulatorio es importante (Guilbault et al., 1991). La presencia de un folículo dominante al momento de iniciar la superovulación ha sido asociada con una disminución en la respuesta superovulatoria (Grasso et al., 1989).

Existe un pico de FSH aproximadamente 24 hrs. después del pico preovulatorio de LH (Totey et al., 1989; Boland et al., 1991). Aunque la función de este segundo pico de FSH no es muy clara (Boland et al., 1991), se sugiere que puede ser el responsable del reclutamiento folicular (Ware et al., 1988).

La administración de FSH después de la ovulación, ayuda a incrementar el pico normal de FSH y puede influenciar el reclutamiento y/o selección de los folículos. El tratamiento de folículos preantrales con gonadotropinas para prevenir atresia, puede ser una estrategia para incrementar la respuesta ovulatoria (Boland et al., 1991).

Se han hecho intentos para mejorar la respuesta ovulatoria de vacas superovuladas, mediante la aplicación de pequeñas dosis de FSH en la fase temprana del ciclo estral; sin embargo, existe controversia en los resultados. Algunos autores reportan un efecto nulo del pretratamiento (Guilbault et al., 1988; Guilbault et al., 1991), mientras otros autores reportan un efecto positivo (Ware et al., 1988; Touati et al., 1989, Touati et al., 1991).

La FSH es utilizada para superovular a dosis que varían entre 30 y 50 mg administrada dos veces diariamente en forma constante o decreciente por cuatro o cinco días. Es necesario dar dos inyecciones diarias debido a que su vida media es corta (Boland et al., 1991). La actividad antigénica de esta hormona es reducida (Seidel y Moore, 1991; Hahn, 1992).

La Gonadotropina coriónica de yegua preñada (PMSG) es usada regularmente en dosis que varían de 1500 a 3000 U.I. Es administrada en una sola dosis por vía subcutánea o intramuscular, debido a su larga vida media (aproximadamente 50 horas) (Jillella, 1982; Peters y Ball, 1987; Seidel y Moore, 1991).

La utilización de PMSG tiene algunas desventajas como la formación de anticuerpos y en consecuencia la disminución de la respuesta superovulatoria en tratamientos subsecuentes (Jillella, 1982).

La PMSG induce el crecimiento folicular después de la ovulación produciendo un ambiente uterino con alto contenido de estrógenos, lo cual puede afectar negativamente el desarrollo embrionario temprano, así como el transporte de gametos (Greve et al., 1983; Boland et al., 1991).

Se han producido anticuerpos contra PMSG, los cuales se aplican normalmente 60 h después de la inyección de prostaglandinas, ocasionando una caída rápida en la concentración de esta hormona hasta niveles no detectables después de dos horas, mejorando la tasa de ovulación, así como la tasa de fertilización (Boland et al., 1991).

2.4. Sincronización del estro.

La sincronización adecuada entre el embrión y la receptora es uno de los factores claves para el éxito de la transferencia de embriones (Sreenan y Diskin, 1987; Ashworth, 1992; Thibier y Nibart, 1992). El feto sintetiza proteínas, prostaglandinas, y esteroides que junto con los esteroides ováricos, modifican bioquímica y morfológicamente el ambiente uterino. Una relación inadecuada entre los elementos anteriores o "asincronía", puede inducir mortalidad embrionaria (Ashworth, 1992).

Las tasas de gestación más altas se han obtenido cuando un embrión es transferido a un ambiente uterino semejante al ambiente uterino de donde originalmente proviene. De tal manera que un embrión colectado el día siete (estro = día cero), debería ser transferido a receptoras que estén en el día siete de su ciclo.

La sincronización se logra mediante el control del ciclo estral con la administración de prostaglandinas o progestágenos (Seidel y Elsdén, 1989).

La prostaglandina es inyectada al tercer día del tratamiento superovulatorio cuando se utiliza FSH (Jillella, 1982; Seidel y Elsdén, 1989; Seidel y Moore, 1991; Hahn, 1992). Una segunda dosis de prostaglandina entre 12 y 24 horas después de la primera dosis tiende a mejorar la producción de embriones (Looney et al., 1985; Seidel y Moore, 1991).

La sincronización de celo en las receptoras involucra la aplicación de una o dos dosis de prostaglandinas (Curtis, 1990). Generalmente, se recomienda realizar la aplicación entre 12 y 18 horas antes que la donadora (Jillella, 1982; Seidel y Moore, 1991). Cuando se utilizan progestágenos, estos son administrados por 9 ó 10 días (Curtis, 1990).

El otro aspecto importante es la eficiencia en la detección de estro, que depende de muchos factores y quizá el más importante sea el número de observaciones al día (Jillella, 1982; Greve, 1986, Seidel y Moore, 1991). Debido a que el estro puede presentarse 12 horas antes o después de lo esperado (Curtis, 1990), se recomienda realizar observaciones un día antes y un día después del día en que se espera el estro (Jillella, 1982). Cuatro observaciones de 30 minutos distribuidas en todo el día nos permiten establecer el grado de sincronización de las receptoras y la donadora (Jillella, 1982; Seidel y Moore, 1991).

El estro se presenta aproximadamente a las 45 horas del tratamiento con prostaglandinas (Greve, 1986; Seidel y Moore, 1991). Ocasionalmente algunas donadoras no exhiben signos de estro y son inseminadas temprano en el proestro o tarde en el metaestro y tienen baja producción de embriones (Greve, 1986). En estos casos el uso de ayudas que mejoren la eficiencia en la detección de calor puede ser de utilidad (Seidel y Moore, 1991).

2.5. Servicio a la donadora.

El servicio puede llevarse a cabo mediante inseminación artificial o monta natural. Algunas recomendaciones cuando se usa inseminación son: tres dosis, una dosis sencilla a las 12 horas y dosis doble a las 24 horas de iniciado el estro (Seidel y Elsdén, 1989; Curtis, 1990; Seidel y Moore, 1991).

Los dos puntos importantes que deben ser considerados al realizar la inseminación son: Asepsia al momento de la inseminación y evaluar la calidad del semen (Jillella, 1982).

El tratamiento superovulatorio provoca que el tracto reproductivo sea muy sensitivo, por lo que una manipulación excesiva debe ser evitada, además de que muchos folículos todavía no han ovulado y pueden romperse (Seidel y Moore, 1991).

2.6. Recolección de embriones.

La recolección de embriones no quirúrgica se realiza entre los días seis y ocho después del estro (Jillella, 1982; Seidel y Elsdén, 1989; Curtis, 1990; Seidel y Moore, 1991). Si los embriones son recolectados después pueden tener la zona pelúcida rota, se dificulta su manipulación y aumenta el riesgo de daño e infección (Seidel y Moore, 1991).

El procedimiento de la técnica es el siguiente:

El primer paso es palpar los ovarios por vía rectal, para estimar el número de cuerpos lúteos. Esto es difícil hacerlo acertadamente, cuando la respuesta a la superovulación es grande (Seidel y Moore, 1991).

La vaca es introducida en una rampa elevada de la parte frontal y se le aplica anestesia epidural (Xilocaína al 2%). La región perianal y vulvar es lavada y desinfectada. Si es necesario se introduce un dilatador cervical de acero inoxidable estéril, con el fin de facilitar la introducción del catéter de Foley. Se retira el dilatador y se introduce cuidadosamente el catéter con un estilete de acero inoxidable estéril a través del cervix y es dirigido hacia uno de los cuernos, cuando está bien ubicado se infla el globo con 10 a 15 cm de aire. El estilete es retirado suavemente una vez que se asegura que el catéter quedó bien colocado y se conecta la manguera en forma de T o Y. El tubo de entrada se conecta a la botella que contiene el medio (Solución buffer fosfatada (PBS) + 1 % de suero fetal bovino, penicilina y estreptomicina) a 37°C y el tubo de salida es conectado a un filtro de 75 μ (EM CON, USA) para separar los embriones, que descarga a una probeta graduada de un litro. La botella que contiene el medio se eleva 50 a 75 cm arriba de la vaca, de manera que se permita el flujo por gravedad (Jillella, 1982, Seidel y Moore, 1991).

Aproximadamente, 100 a 150 ml de medio se introducen al cuerno, el cual es mantenido en la palma de la mano mientras el fluído entra. Cuando se alcanza un tamaño similar al de una gestación de 6 a 8 semanas, el tubo de entrada es cerrado y se abre el de salida. El cuerno uterino es masajeado suavemente para que salga el medio. Cuando el cuerno está vacío el tubo de salida se cierra y otros 100 a 150 ml son introducidos y se repite el proceso normalmente hasta completar 500 a 1000 ml de medio.

Posteriormente es retirado el cateter y se repite el mismo procedimiento para el otro cuerno usando un cateter nuevo. Finalmente, se recomienda introducir una solución con antibióticos al útero (Jillella, 1982; Seidel y Moore, 1991).

2.7. Evaluación de embriones.

La evaluación de embriones es determinante para el éxito de la transferencia de embriones (Lindner y Wright, 1983). Una vez que los embriones se tienen en el filtro, se pasan a cajas de Petri estériles con un poco de medio y se observan al microscopio estereoscópico, con la finalidad de :

- a) Separar embriones de óvulos no fertilizados.
- b) Seleccionar embriones que serán transferidos.
- c) Seleccionar embriones que serán congelados (Curtis, 1990).

El diámetro total del embrión bovino se estima entre 150 y 190 μ , incluyendo la zona pelúcida de aproximadamente 12 - 15 μ de grosor. El diámetro del embrión permanece sin cambio desde cigoto hasta blastocisto (Lindner y Wright, 1983). Los estadios de desarrollo de embriones bovinos, recobrados comúnmente por el método no quirúrgico se describen a continuación (Lindner y Wright, 1983):

Mórula.- Es una masa de células. Los blastómeros individuales son difíciles de diferenciar uno de otro. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

Mórula compacta.- Los blastómeros se juntan formando una masa celular compacta que ocupa del 60-70% del espacio perivitelino.

Blastocisto temprano.- Es un embrión al que se le ha formado una cavidad con líquido o blastocoele. El embrión ocupa del 70-

80 % del espacio perivitelino. Puede diferenciarse el trofoblasto de la masa celular interna.

Blastocisto.- Diferenciación pronunciada de las capas del trofoblasto exterior, la masa celular interna es más compacta. El blastocele es muy prominente y el embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

Blastocisto expandido.- El diámetro del embrión aumenta drásticamente (1.2- 1.5 veces) y la zona pelúcida de 1/3 del grosor original.

Blastocisto eclosionado.- La zona pelúcida desaparece, los embriones recuperados en este estadio de desarrollo pueden ser esféricos con un blastocele bien definido o colapsado.

En el Cuadro 1 se muestra la edad estimada en días para cada uno de los estadios de desarrollo (Lindner y Wright, 1983).

Cuadro 1. Edad estimada en días para cada estadio de desarrollo

Estadio de desarrollo	Edad estimada (Días)
Mórula	5
Mórula compacta	6
Blastocisto temprano	7
Blastocisto	7
Blastocisto expandido	8
Blastocisto eclosionado	9

(Lindner y Wright, 1983)

El evaluador debe registrar los siguientes criterios: edad (días postestro), estado de compactación, variabilidad en tamaño de las células, color del citoplasma, áreas degeneradas, número de

blastómeros extruídos, tamaño del espacio perivitelino, estado de desarrollo del embrión y número de días que el embrión está retardado de lo normal (Lindner y Wright, 1983; Seidel y Moore, 1991). Posteriormente el embrión es clasificado dentro de una de las siguientes categorías:

Excelente.- Embrión perfecto para su estado, esférico, simétrico, con células de tamaño color y textura uniformes.

Bueno.- Pequeñas imperfecciones tales como zona pelúcida oval, pequeñas células extruídas, forma ligeramente asimétrica.

Regular.- Sin anormalidades severas, tales como un número moderado de células extruídas, tamaño pequeño, pequeñas cantidades de degeneración, un día de retardo en su desarrollo.

Pobre.- Degeneración considerable, células vesiculadas, tamaño de células muy variables, mala compactación, muy pequeño y retardado por dos días en el desarrollo (viable en apariencia).

Degenerado.- Severamente anormal (no es transferible)

No fertilizado.- Sin división celular (Lindner y Wright, 1983; Seidel y Moore, 1991).

2.8. Transferencia de embriones.

El principal problema de éste método, es llegar a dominar eficientemente la técnica. Es necesario tener habilidad para palpar los ovarios y poder determinar cual de ellos presenta la ovulación. Por lo tanto deben ser eliminadas aquellas receptoras que no presenten cuerpo lúteo (Seidel y Moore, 1991).

El procedimiento es el siguiente: El instrumento usado normalmente es la pistola francesa tipo Cassou para

transferencia de embriones. El embrión es aspirado en una pajilla de 0.25 c.c. aspirando primero un poco de medio, luego una burbuja de aire, otro poco de medio con el embrión y finalmente otra burbuja de aire. A la receptora se le aplica anestesia epidural y la región vulvar y perianal es lavada y desinfectada. La pistola es pasada a través del cervix y dirigida hacia el cuerno del lado de la ovulación, depositando cuidadosamente el embrión lo más cerca posible del extremo del cuerno (Jillella, 1982; Seidel y Elsdén, 1989; Curtis, 1990; Seidel y Moore, 1991).

La atención a los detalles es importante para el éxito de un programa de transferencia de embriones (Curtis, 1990).

2.9. Preservación de embriones.

Medio de congelación.

El medio usado comunmente es PBS más 0.4% de albúmina sérica bovina (BSA) o 10% de suero fetal bovino y 10% de glicerol (Pettit, 1985; Seidel y Moore, 1991).

Crioprotectores.

Los embriones están compuestos por más del 80 % de agua y si son congelados inadecuadamente, el agua se convierte en hielo que provoca daño y muerte al embrión, por lo que el agua debe ser removida (Seidel y Elsdén, 1989). Cuando el embrión es colectado y almacenado en un medio isotónico no hay flujo neto de agua del embrión hacia el medio, pero si el embrión es mantenido en un medio hipertónico se colapsará y si se mantiene en un medio hipotónico se expande y estalla (Seidel y Elsdén, 1989).

La formación de hielo inicia en el medio extracelular entre -5° y -6° C, ya sea espontáneamente o por cristalización. Mientras se forman los cristales de hielo en el medio extracelular, la concentración de solutos intracelulares aumenta (Niemann, 1990). Cuando se realiza congelamiento de embriones, la tasa de enfriamiento es un factor determinante en la formación de cristales de hielo en el líquido intracelular. Con un enfriamiento lento las células se deshidratan y con un enfriamiento rápido el líquido intracelular se congela, lo cual puede ser detrimental para la célula, dependiendo de la cantidad y tamaño de los cristales formados (Niemann, 1990). Un enfriamiento muy rápido produce la formación de pequeños cristales de hielo, que no son muy peligrosos para las células. Sin embargo, tienden a formar cristales grandes cuando son descongelados lentamente. Para evitar este tipo de daños es necesario descongelar rápidamente las células que fueron congeladas rápidamente (Niemann, 1990). Las células que fueron congeladas lentamente deben ser descongeladas lentamente, para evitar el daño por la entrada rápida de agua (Niemann, 1990).

Con el fin de evitar este tipo de daños se utilizan compuestos químicos llamados crioprotectores, los cuales pueden ser de dos tipos:

- a) Crioprotectores permeables tales como el glicerol, dimetil sulfóxido (DMSO), propanediol, etanol y otros alcoholes.
- b) Crioprotectores no permeables como el polivinil- pirrolidon (PVP), sucrosa, glucosa y otros azúcares (Niemann, 1991).

Adición del crioprotector.

La presencia de un crioprotector en el medio de congelación incrementa significativamente la osmolaridad, lo que puede dañar

al embrión; por lo que se sugiere adicionarlo en tres pasos (3.3, 6.7 y 10 %) a intervalos de 10 minutos (Wright, 1985; Seidel y Elsdén, 1989). Sin embargo, se ha demostrado que la adición de 10% o 1.4 M de glicerol en un solo paso, produce tasas de sobrevivencia similares (Niemann, 1991).

Recipientes.

Se han utilizado una gran cantidad de recipientes en la congelación de embriones, sin embargo, en la actualidad la mayoría de los embriones son congelados en pajillas de .25 cc, las cuales tienen un diámetro menor, pared más delgada y contienen un volumen de líquido menor que las ampulas, lo que

resulta en una más rápida y adecuada cristalización y por tanto mejor sobrevivencia (Niemann, 1991).

Proceso de enfriamiento.

Se han desarrollado una gran cantidad de variantes en la tasa de enfriamiento para distintas especies. Algunos de los procedimientos en la congelación de embriones bovinos se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tasas de enfriamiento usadas en la congelación de embriones bovinos.

Autor	Rango (/C)	Tasa (/min)
Pettit (1985)	20 a -6	1
	-6 a -7	Cristalización
	-7 a -35	0.3
	-35 a -38	0.1
	-38	Nitrógeno líquido
Wright (1985)	Temp. ambiente a -7	1
	-7	Cristalización
	-7 a -35	0.3
	-35 a -38	0.1
	-38	Nitrógeno líquido
Seidel y Elsden (1991)	Temp. ambiente a -7	Rápida o lentamente
	-7	Cristalización
	-7 a -30	0.5
	-30	Nitrógeno líquido
Niemann (1991)	Temp. ambiente a -7	Directo
	-7	Cristalización
	-7 a -30 ó -35	0.3
	-30 ó -35	Nitrógeno líquido

Inducción de cristalización

La cristalización o "Seeding", se refiere a la formación de hielo en la muestra, lo cual se logra tocando un extremo de la pajilla con una pinza hemostática enfriada previamente en nitrógeno líquido (Wright, 1985; Niemann, 1991; Seidel y Moore, 1991).

Descongelamiento.

El método de descongelamiento depende del método usado en la congelación. El más común de dos pasos (tasa de enfriamiento lenta y sumergir en nitrógeno líquido), permite usar un descongelamiento rápido en agua a 35/ C o en aire a temperatura ambiente. El contenido de la pajilla es vaciado en un caja de Petri que contiene medio con una concentración igual de crioprotector (Niemann, 1991).

Remoción del crioprotector.

El crioprotector no puede ser removido de un solo paso. Requiere de un proceso de dilución (5 pasos de 10 minutos) o el uso de sucrosa, un azúcar que previene el choque osmótico durante la remoción del crioprotector. El choque osmótico ocasiona lisis de las células por la entrada rápida de agua, mientras el crioprotector sale lentamente (Niemann, 1991).

El uso de sucrosa mejora la sobrevivencia embrionaria, en comparación con el método de 5 pasos, mediante el cual puede ser destruída la membrana del embrión. Sin embargo, es difícil manejar el embrión en una solución de sucrosa, debido a que éste flota. Por lo que se usa el siguiente procedimiento:

- a) Pasar el embrión a una solución que contenga 0.7 m de glicerol y 0.7 M de sucrosa, durante 5 a 10 minutos.
- b) Pasar el embrión a una solución 0.7 M de sucrosa por 5 a 10 minutos.
- c) Lavar el embrión varias veces con PBS (Niemann, 1991).

3. Aplicaciones de la transferencia de embriones.

La transferencia de embriones ha motivado la imaginación de los investigadores, debido a sus múltiples aplicaciones en la producción animal y medicina humana (Jillella, 1982). A continuación se indican algunas de las aplicaciones presentes y potenciales de la transferencia de embriones:

- 1.- Incrementa la progenie de una hembra genéticamente superior.
- 2.- Multiplicación de razas bovinas exóticas.
- 3.- Reduce el intervalo entre generaciones.
- 4.- Producción de mellizos.
- 5.- Sexado de embriones.
- 6.- Almacenamiento de embriones por largo tiempo.
- 7.- Transporte internacional de embriones.
- 8.- Producción de gemelos idénticos (monocigóticos).
- 9.- Clonación (Jillella, 1982; Seidel y Elsdén, 1989).

4. Factores que afectan la respuesta superovulatoria.

La variabilidad en la respuesta ovárica a los tratamientos superovulatorios es una gran desventaja para el uso económico de la transferencia de embriones y limita su uso en la producción animal.

A pesar de las investigaciones realizadas, no ha sido posible disminuir significativamente dicha variabilidad (Crister et al., 1980; Boland et al., 1991; Hahn, 1992).

Una alta variabilidad y producción deficiente de embriones viables representa un fuerte obstáculo, para el uso eficiente de la transferencia de embriones en ganado bovino (Greve et al., 1983).

Algunos de los factores causantes de dicha variabilidad son los siguientes:

4.1. Edad.

La respuesta a los tratamientos de superovulación disminuye a medida que aumenta la edad de la donadora (Lerner *et al.*, 1986; Breuel *et al.*, 1991), lo cual se debe quizá a una disminución en el número de folículos presentes en los ovarios (Lerner *et al.*, 1986). El número de embriones totales (10.8 vs. 7.5) y el porcentaje de embriones transferibles (63 vs. 31 %) (Romero *et al.*, 1991), fue mayor en vaquillas que en vacas adultas.

Algunos autores mencionan que no existe diferencia significativa en la tasa ovulatoria entre edades (Hasler *et al.*, 1980; Hasler *et al.*, 1983). Sin embargo, se observa una disminución en la viabilidad de los embriones recuperados en vacas de más de 10 años (Donaldson, 1985).

4.2. Concentración de progesterona.

La concentración de progesterona en suero al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio, puede ser utilizada como una herramienta para predecir la respuesta de los animales sometidos a superovulación (Thomas, 1988; Callesen *et al.*, 1989). Las donadoras que tuvieron una concentración mayor a 3 ng/ml de progesterona al inicio del tratamiento superovulatorio, produjeron más embriones transferibles que las vacas que tuvieron una concentración menor (7.1 vs. 1.3) (Thomas, 1988).

4.3. Genotipo.

La respuesta ovulatoria a los tratamientos superovulatorios varía entre una raza y otra (Wilson, 1988), algunas razas se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Producción media de embriones por raza de donadora a la primera colección.

Raza	n	Total	Infertilizados	Viables	
				n	%
Angus	35	7.7	1.3	4.9	64
Beef Master	127	11.3	2.3	7.4	65
Brangus	1034	11.8	3.8	6.0	51
Brahman	169	8.9	2.6	4.8	54
Chianina	25	6.3	2.8	3.2	51
Holstein	710	8.5	1.2	6.3	74
Limousin	69	6.2	0.9	4.5	73
Red Brangus	64	13.1	4.6	6.7	51
Saler	18	7.0	1.0	4.2	60
Simbrah	173	12.8	3.1	7.5	59
Santa G.	23	10.8	4.8	4.4	41
Simmental	113	11.6	2.8	7.1	61

(Wilson, 1988)

4.4. Nutrición.

El manejo nutricional es el principal factor limitante o que controla la reproducción (Short y Adams, 1988). Los animales bien alimentados producen más embriones transferibles (6.3 vs. 2.8/donadora) que aquellas con deficiencia de energía, proteína y β -caroteno; así como una inadecuada relación Na:K en la dieta (>10:1). Donadoras con elevados valores de K (>40 mg/ml de suero) produjeron menos embriones (3.8 vs 9.1 y 2.6 vs 3.3/donadora), que donadoras con valores normales. Cuando el balance Na:K fue bajo (6:1), se produjeron más embriones que cuando esta proporción fue más elevada (10:1) (Thomas, 1988). Las deficiencias tanto de cobre como de selenio provocan la producción de embriones de baja calidad (O'Gorman et al., 1987; Roffey, 1989)

Los niveles de grasa subcutánea no afectan la producción de embriones. Sin embargo, una excesiva deposición de grasa en el área de la bursa ovárica y oviductos, puede interferir con el pasaje de óvulos y la tasa de fertilización (Bielanski y Yadav, 1990).

4.5. Gonadotropina.

La PMSG o FSH son usadas para inducir superovulación en el bovino. La estimulación del ovario se hace regularmente en la fase luteal entre los días 8 y 11 del ciclo estral (Hahn, 1992).

Un alto porcentaje de animales superovulados desarrollan niveles anormales de progesterona en plasma (39.5%), así como de LH (31.6%), lo que causa efectos adversos sobre: Producción de embriones, calidad embrionaria y tasa de fertilización. El efecto es más marcado con PMSG (Greve *et al.*, 1983). Dicho problema explica en parte la mayor producción de óvulos con el uso de FSH (Greve *et al.*, 1983), alto número de embriones de mejor calidad y algunas veces incremento en el número de gestaciones (Boland *et al.*, 1991).

5. Factores que afectan la tasa de gestación.

El establecimiento de la gestación involucra una compleja serie de interrelaciones, entre el embrión, su ambiente uterino y el cuerpo lúteo. El embrión produce proteínas, esteroides y prostaglandinas con efectos tanto luteotrópicos como antiluteolíticos y pueden también tener efectos reguladores en el flujo de sangre hacia el útero, disponibilidad de nutrientes, migración embrionaria y otros eventos asociados con el establecimiento y mantenimiento de la gestación (Bazer, 1986).

Excluyendo los fracasos en la fertilización y pérdidas embrionarias antes del día seis u ocho, el complejo de factores que determinan ya sea muerte embrionaria o sobrevivencia posterior a la inseminación, son los mismos que operan después de la transferencia de embriones a la receptora. Sin embargo, los procedimientos de la transferencia de embriones permiten el control de algunos factores que influyen la sobrevivencia embrionaria posterior. Dichos factores pueden ser: embrionarios, maternos o ambientales (Sreenan y Diskin, 1987). A continuación se indican los más importantes:

5.1. Embrionarios.

Calidad del embrión.

La evaluación morfológica de calidad del embrión es subjetiva y varía entre individuos (Sreenan y Diskin, 1987). En términos generales se dice que existen diferencias significativas entre las tasas de gestación producidas por las distintas categorías utilizadas (Lindner y Wright, 1983; Hasler et al., 1987; Sreenan y Diskin, 1987; Webb y Hasler, 1988; Seidel y Moore, 1991) (Cuadro 4). La misma situación se observa al transferir embriones congelados (Godkin et al., 1987; Payas et al., 1989).

Cuadro 4. Tasas de gestación (%) producidas por embriones de distinta calidad

Categoría	Lindner y Wright (1985)	Webb y Hasler (1988)	Seidel y Moore (1991)
Excelente	45 ^a		63 ^a
Bueno	44 ^a	50	58 ^a
Regular	27 ^b	38	31 ^b
Pobre	20 ^b	12	12 ^c

^{abc} Columnas con letras en común no son estadísticamente diferentes ($P > 0.05$).

5.2. Maternos.

Si consideramos la disponibilidad de un embrión de buena calidad y un operador eficiente, entonces la receptora es determinante en el éxito de la transferencia de embriones (Broadbent et al., 1991).

Sincronización.

La tasa de gestación disminuye conforme aumenta la asincronía, aunque existe una tolerancia de aproximadamente ± 1.5 días (Remsen et al., 1982; Hasler et al., 1987; Humbolt et al., 1987; Sreenan y Diskin, 1987).

Edad.

El uso de vacas o vaquillas depende del tipo de explotación que se trate, dado que ambas tienen ventajas y desventajas (Broadbent et al., 1991). Generalmente se seleccionan vaquillas (Thibier y Nibart, 1992) debido a que tienen una mayor tasa de gestación que las vacas (Broadbent et al., 1991; Seidel y Moore,

1991) 79 vs. 61 % (Webb y Hasler, 1988), para embriones frescos y 60 vs. 39 % para embriones congelados (Webb y Hasler, 1988).

Además, se dice que las vaquillas no están bajo estrés nutricional, no presentan anestro postparto, son de un costo menor, tienen menores requerimientos nutricionales y en general requieren menos manejo (Broadbent et al., 1991). Sin embargo, es más difícil pasar el cérvix al momento de la transferencia y es más probable que presenten dificultad al parto (Broadbent et al., 1991; Seidel y Moore, 1991). Vaquillas Angus que recibieron embriones de la raza Limousin o Charolaise, tuvieron problemas al parto (King et al., 1985).

Concentración de progesterona.

La progesterona es importante tanto para el establecimiento como para la mantención de la gestación (Sreenan y Diskin, 1987), así las vacas gestantes tienen una concentración de progesterona significativamente mayor, que las vacas no gestantes (Thompson et al., 1980).

A menudo se recomienda usar la calidad del cuerpo lúteo, evaluada por palpación rectal como criterio para seleccionar a las receptoras, sin embargo, se ha demostrado que el tamaño de cuerpo lúteo (calidad) es muy subjetivo y no es un criterio adecuado para la selección de receptoras, pues no tiene una relación directa con el contenido de progesterona en suero y tasa de gestación (Nieman et al., 1985; Hasler et al., 1987; Humbolt et al., 1987; Remsen et al., 1987; Broadbent et al., 1991).

Se han realizado algunos estudios con el objetivo de relacionar los niveles séricos de progesterona, con la subsecuente manutención de una gestación en receptoras de embriones. Así,

Hasler *et al.* (1980), Nieman (1985) y Gastelum *et al.* (1992), reportan que no hubo diferencia significativa en el nivel de progesterona en suero en el día de la transferencia de vacas que quedaron gestantes, con respecto a vacas que no quedaron gestantes.

Existe un nivel óptimo de progesterona entre 2.5 y 3.0 ng/ml, animales por abajo de 2 ng/ml, difícilmente quedaran gestantes. Un nivel por arriba de 5 ng/ml disminuye la tasa de gestación (Remsen *et al.*, 1982; Markette *et al.*, 1985; Nieman *et al.*, 1985; Northey *et al.*, 1985), lo cual posiblemente se debe a una alteración del balance hormonal de estrógenos y progesterona, necesario para el mantenimiento de un ambiente uterino adecuado, previo a la implantación del embrión (Remsen *et al.*, 1982; Nieman *et al.*, 1985).

En un estudio con vacas Hereford, Stubbings y Walton (1986) reportan que la concentración de progesterona el día de la transferencia fue variable y no fue consistentemente relacionado con las receptoras que quedaron gestantes o no. Sin embargo, la concentración en el día 21 postestro fue un indicador adecuado de los animales que fracasaron en la gestación. Todos los animales que tuvieron una concentración menor que 1 ng/ml no quedaron gestantes, lo que puede servir como indicador para la posible reutilización de las receptoras que no quedaron gestantes. Otra situación que debe ser considerada es el hecho de que algunos animales tuvieron concentraciones mayores de 1 ng/ml a los 21 días y no resultaron gestantes a los 60 días. Lo que se debe probablemente a que vacas que no quedan gestantes presentan ciclos estrales extendidos o sufren muerte embrionaria.

Los reportes son inconsistentes en la relación entre la concentración de progesterona al momento de la transferencia y la tasa de gestación, sin embargo, es claro que existen niveles óptimos (2 a 3 ng/ml), mínimos (< 2 ng/ml) y máximos (5 a 6 ng/ml). Receptoras con niveles de progesterona por abajo o por arriba de los indicados tienen pocas probabilidades de quedar gestantes.

5.3. Ambientales.

Facilidad en la transferencia.

La transferencia debe llevarse a cabo suavemente y lo más rápido posible (Seidel y Moore, 1991; Thibier y Nibart, 1992). En un estudio donde se evaluó la facilidad en la transferencia no quirúrgica, en una escala de uno a cuatro en base al incremento en el grado de dificultad, se obtuvieron tasas de gestación significativamente mayores para la categoría uno, que para la categoría tres y cuatro (Godkin et al., 1987).

Sitio de deposición.

La transferencia del embrión debe hacerse en el cuerno ipsilateral al ovario que presenta el cuerpo lúteo. La transferencia en el cuerno contralateral resulta en tasas de mortalidad embrionarias altas, debido al fracaso en las señales luteotrópicas y antiluteolíticas del concepto, para llegar al cuerpo lúteo (Sreenan y Diskin, 1987).

El sitio de deposición del embrión en la base (parte más cercana al útero) o en el extremo del cuerno (parte más cercana al ovario) depende de la técnica (quirúrgica o no quirúrgica) (Sreenan y Diskin, 1987). La transferencia quirúrgica en el extremo del cuerno, produce tasas de gestación mayores que en la

base, lo que se debe probablemente a la habilidad para liberar las señales luteotrópicas y antiluteolíticas (Christie et al., 1980).

Estrés.

El estrés tiene efectos adversos sobre todos los aspectos reproductivos y puede ser originado por diversas causas como son: climáticas, manejo, nutricionales, etc. Algunas de las consecuencias son, ausencia de estro y ovulación, baja tasa de gestación, etc. (Maurer y Echternkamp, 1982; Broadbent et al., 1991; Thibier y Nibart, 1992).

Por lo anterior, algunas prácticas de manejo que se recomiendan para evitar dichos efectos son: Mantener a las receptoras en el mismo ambiente físico varias semanas antes y después de la transferencia, mantener a los animales en donde se puedan proteger de la lluvia, viento, sol, etc. evitar cambios de dieta por lo menos seis semanas antes de la transferencia (Broadbent et al., 1991; Thibier y Nibart, 1992).

Nutrición y condición corporal.

El balance energético es el principal factor que controla el éxito reproductivo en la receptora (Broadbent et al., 1991). La condición corporal al parto y al momento del servicio, cambio en condición corporal entre el parto y el servicio, que refleja el suministro de energía en relación con la demanda, afecta el intervalo parto primer estro, tasa de concepción y porcentaje de parición. Una condición adecuada sería de 2.5 (en escala de 1 a 5) al parto y dos al momento de la transferencia (Lowman, 1985). De tal manera que animales por debajo de esta condición, deben ser alimentados para mejorar su condición hasta el momento de la transferencia. Aquellos que estén en esta condición deben

permanecer estáticos o con ligeras ganancias, mientras que aquellos que están en una condición de buena a alta, deben de perder algo de condición (Broadbent *et al.*, 1991). Extremos en

condición corporal o nivel de alimentación deben ser evitados (Sreenan y Diskin, 1987).

La condición corporal influencia la tasa de gestación para embriones transferidos tanto quirúrgica como no quirúrgicamente. Así, receptoras con una condición corporal de tres tuvieron una tasa de gestación de 55% (n=633), dos 53.5% (n=460), y fueron significativamente mayores que aquellas con una condición de <1 44% (n=430) y >4 47% (n=175), de donde se puede observar que animales delgados o muy gordos tienen tasas de gestación menores (Mapletoft *et al.*, 1986).

MATERIALES Y METODOS

En la presente investigación se llevaron a cabo tres experimentos:

EXPERIMENTO I.

Tratamiento superovulatorio y recuperación de embriones en ganado de carne (abril, 1994).

1. Localización.

El presente experimento se realizó en la granja experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, situada a los 19° 31' latitud norte y 98° 53' longitud oeste y a una altitud de 2353 msnm (García, 1981).

El clima prevaleciente en la zona de estudio corresponde al tipo Bs Kw (w) (i'), clima semiseco, templado con verano cálido, con una temperatura media anual entre 12° y 19° C (García, 1981).

2. Manejo de los animales.

Los animales fueron mantenidos en corral recibiendo una dieta a base de silo de maíz, 500 g/día de un concentrado comercial con 12% de proteína y agua a libre acceso. Se registró el peso de los animales cada 15 días.

3. Donadoras.

Las donadoras fueron animales cruzados de las razas Angus x Pardo Suizo y Simmental x (Angus x Pardo Suizo), vacías, ciclando y sin problemas reproductivos. Los animales utilizados fueron 6 animales adultos y cuatro jóvenes.

4. Sincronización del estro.

La sincronización del estro se llevó a cabo mediante la aplicación de 2 dosis de 15 mg de Luprostiol (Prosolvín, Intervet), con un intervalo de 11 días entre una y otra. Una vez sincronizado el ciclo se aplicó un implante de Norgestomet (Crestar, Intervet), el día 10 del ciclo estral (estro = día 0). El implante fue retirado 9 días después.

La detección del estro en donadoras se realizó mediante 4 observaciones de 30 min. a las 6:00, 12:00, 18:00 y 24:00 hrs. Adicionalmente, se utilizaron marcas de pintura en la línea media de la región sacra, con el fin de mejorar la eficiencia en la detección del estro (Peters y Ball, 1987).

Las donadoras fueron servidas mediante inseminación artificial, a las 12, 20 y 28 horas de detectado el estro.

5. Superovulación.

La superovulación se llevó a cabo dos días antes de la remoción del implante, mediante la aplicación de 2500 UI de PMSG (Folligón, Intervet). Con el fin de inducir luteólisis, se aplicaron 15 mg de Luprostiol el día de la remoción del implante.

Los ovarios fueron revisados utilizando ultrasonografía antes de iniciar el tratamiento superovulatorio, con el fin de determinar la presencia de algún folículo dominante (>10 mm).

6. Recolección de embriones.

La recolección de embriones se llevó a cabo el día 7 del ciclo estral, por el método no quirúrgico descrito por Seidel y Moore (1991), utilizando como medio de lavado Solución Hartmann (Abbot) + 1% de Suero fetal bovino, 100 UI/ml de Penicilina y 100 μ g/ml de Estreptomicina.

7. Evaluación de embriones.

La identificación y evaluación de los embriones se llevó a cabo tomando en cuenta los criterios descritos por Lindner y Wright (1983), con ayuda de un microscopio estereoscópico. Los embriones fueron clasificados de la siguiente manera:

Bueno: Embrión ideal, esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniformes.

Regular: Embrión definido pero sin anormalidades severas, presencia moderada de blastómeros extruídos, vesiculación, pocas células degeneradas, con un día de retardo en su desarrollo.

Pobre: Embrión con problemas severos, numerosos blastómeros extruídos, células degeneradas, células de diferente tamaño, gran número de vesículas, con dos días de retardo en su desarrollo (aparentemente viable).

Los embriones que fueron localizados se transfirieron a un medio compuesto de una solución buffer salina fosfatada (PBS) + 10% de suero fetal bovino y mantenidos a temperatura ambiente hasta el momento de su congelación.

8. Preservación de embriones.

Los embriones fueron congelados en un periodo menor de cuatro horas después de su colección. El método utilizado fue el manual, la metodología usada fue descrita por Nieman (1991).

El medio de congelación fue PBS más 10% de glicerol y 10% albúmina sérica bovina (BSA).

El embrión fue transferido a las siguientes soluciones:

PBS + 10% BSA por 10 min.

PBS + 10% BSA + 5% de glicerol por 10 min.

PBS + 10% BSA + 10% de glicerol por 10 min.

El protocolo de enfriamiento fue el siguiente:

De temperatura ambiente a -7°C de manera directa, permaneciendo por 5 minutos, posteriormente se llevó a cabo la cristalización, tocando un extremo de la pajilla con unas pinzas hemostáticas, enfriadas previamente en nitrógeno líquido.

De -7°C hasta -35°C , $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Una vez alcanzada esta temperatura las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido.

9. Análisis estadístico.

Las variables de respuesta medidas fueron: tasa ovulatoria (No. de cuerpos lúteos), producción de embriones (No. de embriones) y tasa de recuperación de embriones (No. de cuerpos lúteos/No. de embriones) fueron analizadas como variables continuas; el efecto de edad y la presencia de un folículo dominante se evaluaron mediante un diseño completamente al azar, por el procedimiento ANOVA, incluido en el paquete estadístico SAS (SAS, 1985), bajo el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media poblacional

A_i = Efecto de edad o folículo dominante

E_{ij} = Error experimental

Se llevaron a cabo pruebas de Bartlett con la finalidad de probar si las varianzas de las poblaciones comparadas eran homogéneas.

El cambio de peso durante el experimento fue analizado como covariable anidado dentro de edad, sin embargo, su efecto no fue significativo por lo que se excluyó del modelo.

EXPERIMENTO II.

Tratamiento superovulatorio, recuperación y transferencia de embriones en ganado de carne (mayo, 1994).

1. Localización.

El presente trabajo se llevó a cabo en la Hacienda de Coronado, ubicada en el municipio de Venado, el cual se localiza al noreste del estado de San Luis Potosí, México, entre los 23 y 24° de latitud norte y los 101 y 102° de longitud oeste.

El clima predominante en la zona de estudio es Bs1 Kw (e); que es un clima seco estepario, con lluvias en verano y extremoso. La temperatura media anual es de 16.4 °C y la precipitación promedio anual es de 522.3 mm (García, 1981).

2. Manejo de los animales.

Las donadoras y receptoras fueron identificadas con aretes de plástico, desparasitadas y vacunadas contra Pasteurellosis, Carbón sintomático y Edema maligno. Además se realizó un muestreo de sangre y se envió al laboratorio con el fin de detectar enfermedades venéreas (Brucelosis, Leptospirosis, Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y Diarrea viral bovina (DVB). Los animales fueron separados en dos grupos por edad (vacas y vaquillas).

Los animales fueron mantenidas en corral, recibiendo 1 Kg de suplemento a base de sorgo, alfalfa, gallinaza, melaza, sales minerales, así como agua y silo de maíz a libre acceso.

3. Donadoras.

Las donadoras utilizadas, fueron 4 animales adultos de la raza Limousin, vacías, ciclando normalmente, sin problemas reproductivos y libres de enfermedades venéreas.

4. Selección de receptoras.

Las receptoras fueron seleccionadas de un grupo de animales cruzados, con dominancia de Beef Master. Se tomaron 12 vaquillas y 13 vacas adultas con una condición corporal media, vacías, ciclando, sin problemas reproductivos y libres de enfermedades venéreas.

5. Superovulación.

La superovulación se llevó a cabo mediante la administración de 20 ml (18mg) de FSH (Folltropin, Vetrepharm, Inc.), aplicada en dos inyecciones diarias a intervalo de 12 horas, en forma decreciente, durante cuatro días, iniciando el día 10 del ciclo estral (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tratamiento superovulatorio utilizado

Día del tratamiento	Hora	Cantidad (ml)	Hormona
1	8:00 a.m.	4	FSH
	6:00 p.m.	4	FSH
2	8:00 a.m.	3	FSH
	6:00 p.m.	3	FSH
3	8:00 a.m.	2	FSH + Pg
	6:00 p.m.	2	FSH + Pg
4	8:00 a.m.	1	FSH
	6:00 p.m.	1	FSH

6. Sincronización del estro.

La sincronización del estro se llevó a cabo mediante la aplicación inicial de dos dosis de 15 mg de Luprostiol (Prosolvin, Intervet), con un intervalo de 10 días a donadoras y receptoras. Posteriormente, la donadora recibió 30 mg de Luprostiol dividido en partes iguales, administradas con la quinta y sexta inyección del tratamiento superovulatorio. Las receptoras recibieron 15 mg de luprostiol 12 horas antes que la donadora.

La detección del estro en donadoras y receptoras se realizó mediante dos observaciones de 30 min. a las 6:00 y 18:00 hrs. Adicionalmente, se utilizaron marcas de pintura en la línea media de la región sacra, con el fin de mejorar la eficiencia en la detección del estro (Peters y Ball, 1987).

Las donadoras fueron servidas utilizando monta natural con toros Limousin a las 12 y 20 horas de detectado el estro.

7. Recolección de embriones.

La recolección de embriones se llevó a cabo el día 7 del ciclo estral, por el método no quirúrgico descrito por Seidel y Moore (1991), utilizando como medio de lavado Solución Hartmann, (Abbot) + 1% de BSA, 100 UI/ml de Penicilina y 100 µg/ml de Estreptomicina.

8. Evaluación de embriones.

La identificación y evaluación de los embriones se llevó a cabo tomando en cuenta los criterios descritos para el experimento I.

9. Transferencia de embriones.

La transferencia de embriones se realizó por el método no quirúrgico descrito por Seidel y Moore (1991), utilizando la pistola alemana para transferencia de embriones (Minitub).

El diagnóstico de gestación se llevó a cabo por palpación rectal a los 60 días después de la transferencia.

10. Preservación de embriones.

Los embriones excedentes fueron congelados utilizando la metodología descrita en el experimento I.

11. Toma de muestras de sangre.

Las donadoras fueron muestreadas el día de inicio del tratamiento superovulatorio y el día de la recolección de embriones. Las receptoras, por otro lado fueron muestreadas el día de la transferencia.

Las muestras de sangre (10 ml) fueron tomadas de la vena caudal en tubos vacutainer, centrifugadas, con el fin de separar el suero, que fue mantenido en congelación a -20°C hasta el momento del análisis de progesterona por radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida (Srikandakumar et al., 1986).

12. Análisis estadístico.

El efecto de edad sobre la incidencia del estro y tasa de gestación, así como la relación entre la concentración de progesterona en suero y tasa de gestación, se analizaron mediante tablas de contingencia utilizando una prueba de χ^2 .

EXPERIMENTO III.

Tratamiento superovulatorio, recuperación y transferencia de embriones en ganado de carne (Noviembre, 1994).

Este experimento fue similar al experimento II, por lo cual a continuación solamente se describen las diferencias.

1. Donadoras.

Las donadoras utilizadas fueron cuatro animales adultos y cuatro jóvenes de la raza Limousin.

2. Receptoras.

Las receptoras utilizadas fueron 21 vaquillas y 18 vacas adultas.

3. Superovulación.

El tratamiento superovulatorio fue el mismo que el del experimento II, excepto que en este caso se realizó un

pretratamiento con 2.5 ml de Folltropin los días tres y cuatro del ciclo estral (Touati, 1991).

4. Sincronización del estro.

La sincronización del estro en donadoras se llevó a cabo mediante la aplicación de un implante de Norgestomet (Crestar, Intervet) durante 10 días. Posteriormente, recibieron 30 mg de Luprostiol dividido en partes iguales, administradas con la quinta y sexta inyección del tratamiento superovulatorio, el cual se inició el día 10 del ciclo estral (estro = día 0). Las receptoras recibieron un implante de Norgestomet durante 9 días, cuya remoción coincidió con la segunda aplicación de prostaglandina de la donadora.

5. Recolección de embriones.

La recolección de embriones se llevó a cabo el día 7 del ciclo estral, por el método no quirúrgico descrito por Seidel y Moore (1991), utilizando como medio de lavado PBS + 1% de BSA, 100 UI/ml de Penicilina y 100 µg/ml de Estreptomina, a 37 °C.

6. Transferencia de embriones.

La transferencia de embriones se realizó por el método no quirúrgico descrito por Seidel y Moore (1991), utilizando la pistola francesa tipo Cassou para transferencia de embriones.

7. Análisis estadístico.

Se llevaron a cabo pruebas de Bartlett con la finalidad de probar si las varianzas entre las poblaciones comparadas eran homogéneas.

El efecto de edad sobre tasa de ovulación, producción de embriones y tasa de recuperación de embriones se evaluó mediante un diseño completamente al azar por el procedimiento ANOVA, incluido en el paquete estadístico SAS (SAS, 1985), bajo el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media poblacional

A_i = Efecto de edad

E_{ij} = Error experimental

El efecto de edad sobre la incidencia del estro y tasa de gestación, así como la relación entre la concentración de progesterona en suero y tasa de gestación, se analizaron mediante tablas de contingencia utilizando una prueba de χ^2 .

RESULTADOS

EXPERIMENTO I.

a) Incidencia y distribución de la frecuencia del estro.

Los datos de incidencia y frecuencia del estro son presentados de manera conjunta para ambas edades (jóvenes y adultas), debido a que el número de animales es muy reducido.

i) Incidencia del estro. El 90% de los animales ($n=10$) respondió a la primera aplicación de prostaglandinas (Pg). El 100% de los animales respondió a la segunda aplicación de Pg y a la aplicación del implante de Norgestomet.

ii) Distribución de la frecuencia del estro. El tiempo de respuesta promedio para la primera aplicación de Pg fue de 76 h. El 10% de los animales fueron detectados en estro a las 48 h, 30% a las 72 h y 50% a las 96 h. En la segunda aplicación de Pg todos los animales respondieron antes de las 72 h. El tiempo de respuesta promedio posterior a la remoción del implante de Norgestomet fue de 31 h, el 40% de los animales fue detectado las 24 h y el 60% a las 48 h. Debido a la poca cantidad de datos no se llevó a cabo análisis estadístico.

b) Efecto de edad sobre la respuesta superovulatoria.

i) Efecto de edad sobre la tasa ovulatoria. Los 10 animales respondieron al tratamiento de superovulación. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre edades ($P>0.78$) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de edad sobre la tasa ovulatoria
Experimento I)

Edad	n	Tasa ovulatoria	
		Total	$\pm$ E.E.
Joven	4	26	6.5 ± 1.4 N.S
Adulta	6	41	6.8 ± 2.1

N.S. = La diferencia entre tratamientos no fue significativa ($P > 0.05$).

ii) Efecto de edad sobre la producción de embriones. El efecto de edad no fue significativo sobre la producción de embriones totales ($P > 0.32$) y embriones transferibles ($P > 0.75$) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de edad sobre la producción de
embriones (Experimento I)

Edad	n	Embriones totales	Embriones transferibles	
		$\pm$ E.E.	$\pm$ E.E.	
Joven	4	3.0 ± 1.0	1.2 ± 1.2	N.S.
Adulta	6	2.5 ± 0.7	1.6 ± 0.6	

iii) Efecto de edad sobre la tasa de recuperación de embriones.

La tasa de recuperación de embriones fue mayor en los animales adultos (56.0%) que en los animales jóvenes (52.7%), sin embargo, la diferencia no fue significativa ($P > 0.90$).

c) Efecto de la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la respuesta ovulatoria.

i) Efecto de la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la tasa ovulatoria. La presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio, no tuvo un efecto significativo sobre la tasa ovulatoria ($P > 0.22$) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de la presencia de un folículo dominante al inicio el tratamiento superovulatorio sobre la tasa ovulatoria (Experimento I)

Tasa ovulatoria			
Folículo	n	Total	± E.E.
Presencia	6	32	5.3 ± 1.4 N.S
Ausencia	4	35	8.7 ± 2.4

ii) Efecto de la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la producción de embriones. La presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio, tuvo un efecto significativo sobre la producción de embriones totales ($P < 0.01$) y embriones transferibles ($P < 0.03$) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la producción de embriones (Experimento I)

Folículo	n	Embriones totales ± E.E.	Embriones transferibles ± E.E.
Presencia	6	2.1 ± 0.5 *	0.5 ± 0.3 *
Ausencia	4	3.5 ± 1.1	3.0 ± 1.0

* = Las diferencias entre tratamientos son significativas ($P < 0.05$).

iii) Presencia de un folículo dominante el día 10 del ciclo estral. La tasa ovulatoria de los animales que presentaron un folículo dominante en la tercera revisión (5.3 cuerpos lúteos) fue menor que los animales que no presentaron folículo (8.7 cuerpos lúteos). Los animales que presentaron un folículo dominante en dos de las revisiones tuvieron una tasa ovulatoria de 5.2, mientras que los que tuvieron un folículo en una revisión tuvieron una tasa ovulatoria de 6.3. Los animales que no presentaron folículo dominante en las tres revisiones

tuvieron una tasa ovulatoria de 11, mientras que un animal que presentó folículo durante las tres revisiones tuvo una tasa ovulatoria de 3 (Cuadro 10). No se realizó análisis estadístico para estos datos.

Cuadro 10. Efecto de la presencia de un folículo dominante el día 10 del ciclo estral, durante dos ciclos inducidos (Ciclos 1 y 2) y al inicio del tratamiento superovulatorio (Ciclo 3), sobre la tasa ovulatoria (Experimento I)

Vaca	Edad	Ciclo estral			Tasa ovulatoria
		1	2	3	
12041	Joven	1	1	1	3
4003	Adulta	1	1	2	6
12056	Joven	1	2	2	7
4009	Adulta	1	2	1	7
3002	Adulta	1	2	1	2
12059	Joven	2	2	2	6
9022	Adulta	2	2	2	16
12022	Joven	2	2	1	10
2015	Adulta	2	2	1	2
6017	Adulta	2	1	1	8

1 = Presencia de folículo 2 = Ausencia de folículo

EXPERIMENTO II.

a) Efecto de edad sobre la incidencia y distribución de la frecuencia del estro.

i) Efecto de edad sobre la incidencia del estro. El 44% de las receptoras respondió a la primera aplicación de Pg. El 84% de los animales respondió a la segunda y tercera aplicación de Pg. Sin embargo, el efecto de edad no fue significativo ($P > 0.30$). En el cuadro 11 se muestra el efecto de edad sobre la probabilidad de incidencia del estro.

Cuadro 11. Efecto de edad sobre la probabilidad de incidencia del estro en las tres aplicaciones de Pg (Experimento II)

Edad	n	Aplicación de Pg		
		1a	2a	3a
Joven	12	(.42)	(.92)	(.92) N.S.
Adulta	13	(.46)	(.77)	(.77)

ii) Efecto de edad sobre la distribución de la frecuencia del estro. El tiempo de respuesta disminuyó en la tercera aplicación con respecto a las dos primeras aplicaciones, de manera que la mayoría de los animales se concentró a las 48 y 72 h (Cuadro 12). No se llevó a cabo análisis estadístico.

Cuadro 12. Efecto de edad sobre la distribución de la frecuencia del estro (Experimento II)

Aplicación de Pg	Edad	Tiempo de respuesta (h)			Tiempo promedio(h)
		48	72	96	
		n (%)	n (%)	n (%)	
Primera	Joven			5 (100)	96
	Adulta		4 (67)	2 (33)	68
Segunda	Joven	1 (8)	5 (46)	5 (46)	78
	Adulta	3 (30)	6 (60)	1 (10)	67
Tercera	Joven	7 (64)	4 (36)		49
	Adulta	4 (40)	4 (40)	2 (20)	59

b) Respuesta superovulatoria.

La tasa ovulatoria promedio fue de 13 cuerpos lúteos, el promedio de embriones totales 10 y embriones transferibles 7.2. La tasa de recuperación de embriones fue en promedio de 79%.

c) Efecto de edad sobre la tasa de gestación.

El 25% de los animales jóvenes y el 38% de los adultos quedaron gestantes. La diferencia no fue estadísticamente significativa (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto de edad sobre la tasa de gestación de vacas receptoras de embriones (Experimento II)

Edad	n	Gestación	
		Si (%)	No (%)
Joven	8	2 (25)	6 (75) N.S.
Adulta	8	3 (38)	5 (62)

d) Concentración de progesterona en suero sanguíneo.

i) Efecto de la concentración de progesterona en suero al momento de la transferencia sobre la tasa de gestación. El coeficiente de variación para el ensayo de progesterona fue de 2.46% y la sensibilidad de .094 ng/ml. La concentración de progesterona promedio fue de 1.26 ng/ml para los animales que quedaron gestantes y de 1.06 ng/ml para las que no quedaron gestantes. Sin embargo, la diferencia no fue significativa ($P > 0.48$). Para efecto de análisis los datos fueron separados en dos clases (< 1 y > 1 ng/ml) (Cuadro 14). Sin embargo, la diferencia entre clases no fue significativa ($P > 0.18$).

Cuadro 14. Efecto de la concentración de progesterona en suero al momento de la transferencia sobre la tasa de gestación (Experimento II)

Concentración (ng/ml)	n	Gestación	
		Si (%)	No (%)
< 1	7	1 (14)	6 (86) N.S.
> 1	9	4 (44)	5 (56)

ii) Concentración de progesterona en suero al inicio del tratamiento superovulatorio y el día de la recolección de embriones. No existe una correlación entre la concentración de progesterona el día de inicio del tratamiento superovulatorio y la tasa ovulatoria ($r=-0.28$). Los animales que tuvieron una concentración de progesterona al momento de la recolección mayor a 2.5 ng/ml, tuvieron una tasa ovulatoria alta (15), sin embargo, la correlación fue baja ($r=0.22$) (Cuadro 15).

Cuadro 15. Concentración de progesterona el día del tratamiento superovulatorio y el día de la recolección de embriones (Experimento II)

Vaca	Concentración de Progesterona (ng/ml)		
	Inicio del tratamiento	Recolección	Tasa Ovulatoria
97	2.52	11.60	14
99	0.43	2.90	18
98	0.78	3.45	13
49	1.37	2.13	7

EXPERIMENTO III.

a) Efecto de edad sobre la incidencia y distribución de la frecuencia del estro.

i) Efecto de edad sobre la incidencia del estro. En general el 87% de los animales respondió a la aplicación del implante de Norgestomet. El 95% de las vacas jóvenes y el 78% de las adultas respondieron al tratamiento, sin embargo, la diferencia no fue significativa ($P > 0.09$) (Cuadro 16).

Cuadro 16. Efecto de edad sobre la incidencia del estro
(Experimento III)

Edad	n	Incidencia			
		Si	(%)	No	(%)
Joven	21	20	(95)	1	(5) N.S.
Adulta	18	14	(78)	4	(22)

ii) Efecto de edad sobre la distribución de la frecuencia del estro. El tiempo de respuesta promedio posterior a la remoción del implante de Norgestomet fue de 34 y 38 h para animales jóvenes y adultos, respectivamente. El 15% de los animales jóvenes y 8% de los adultos fueron detectados en estro a las 24 h, 85% de los animales jóvenes y 92% de los adultos a las 48 h. No se realizó análisis estadístico en estos datos.

b) Efecto de edad sobre la respuesta superovulatoria.

i) Efecto de edad sobre la tasa ovulatoria. Las 8 donadoras respondieron al tratamiento superovulatorio. No hubo diferencia significativa entre edades ($P > 0.43$) (Cuadro 17).

Cuadro 17. Efecto de edad sobre la tasa ovulatoria (Experimento III)

Tasa ovulatoria			
Edad	n	Total	± E.E.
Joven	4	41	10.2 ± 1.3 N.S
Adulta	4	31	7.5 ± 3.0

ii) Efecto de edad sobre la producción de embriones. La edad no tuvo efecto significativo sobre la producción de embriones totales ($P>0.10$) ni embriones transferibles ($P>0.74$) (Cuadro 18). Un animal adulto no fue lavado debido a que presentó solo dos ovulaciones.

Cuadro 18. Efecto de edad sobre la producción de embriones (Experimento III)

Edad	n	Embriones totales ± E.E.	Embriones transferibles ± E.E.
Joven	4	5.7 ± 1.1	4.0 ± 1.0 N.S.
Adulta	3	7.3 ± 4.0	5.3 ± 4.3

iii) Efecto de edad sobre la tasa de recuperación de embriones. La tasa de recuperación de embriones fue mayor en los animales adultos (62.3%) que en los animales jóvenes (56.5%), sin embargo, la diferencia no fue significativa.

c) Efecto de edad sobre la tasa de gestación.

El 71% de las vacas jóvenes y 50% de las adultas quedaron gestantes. No hubo diferencia significativa ($P>0.26$) entre edades (Cuadro 19).

Cuadro 19. Efecto de edad sobre la tasa de gestación de vacas receptoras de embriones (Experimento III)

Edad	n	Gestación			
		Si	(%)	No	(%)
Joven	14	10	(71)	4	(29) N.S.
Adulta	12	6	(50)	6	(50)

d) Concentración de progesterona en suero sanguíneo.

i) Efecto de la concentración de progesterona en suero al momento de la transferencia sobre la tasa de gestación. El 61% de las vacas transferidas quedó gestante, la concentración de progesterona promedio fue de 0.76 ng/ml, mientras que para las que no quedaron gestantes fue de 0.48 ng/ml, sin embargo, la diferencia no fue significativa. Para fines de análisis los

animales fueron separados en dos clases (<1 y >1 ng/ml) (Cuadro 20). Sin embargo, no hubo diferencias ($P>0.32$) entre ambas clases.

Cuadro 20. Efecto de la concentración de progesterona al momento de la transferencia sobre la tasa de gestación (Experimento III)

Concentración (ng/ml)	n	Gestación	
		Si (%)	No (%)
< 1	21	12 (57)	9 (43) N.S.
> 1	5	4 (80)	1 (20)

ii) Concentración de progesterona al inicio del tratamiento superovulatorio y el día de la recolección de embriones. La concentración de progesterona al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio, no tiene relación con la tasa ovulatoria ($r=0.21$). Los animales que tuvieron una concentración de progesterona al momento de la recolección mayor a 2 ng/ml, tuvieron una tasa ovulatoria de 11.6 y tuvieron una correlación alta ($r=0.86$) (Cuadro 21).

Cuadro 21. Efecto de la concentración de progesterona el día del tratamiento superovulatorio y el día de la recolección de embriones sobre la tasa ovulatoria (Experimento III)

Edad	Vaca	Concentración de Progesterona (ng/ml)		Tasa ovulatoria
		Inicio de tratamiento	Recolección	
Joven	48	1.48	1.53	7
Joven	50	0.76	3.35	9
Joven	25	0.94	2.52	13
Joven	46	0.49	3.05	12
Adulta	97	1.22	5.38	16
Adulta	99	2.33	2.35	8
Adulta	98	1.57	0.88	5
Adulta	49	0.74	-	2

DISCUSION

SINCRONIZACION DEL ESTRO

EXPERIMENTO I.

a) Incidencia del estro.

La respuesta a la primera (90%) y segunda (100%) aplicación de Pg, fue mayor a los trabajos reportados en la literatura (Burfening et al., 1978; Jhonson, 1978), quienes reportan rangos de respuesta de 40 a 70% para la primera aplicación y de 71 a 90% para la segunda aplicación. La proporción del 10 a 29% de animales que no responden para la segunda aplicación, puede ser debida a una aplicación inadecuada de la Pg o a fallas en la detección del estro (Peters y Ball, 1987); en nuestro caso el número reducido de animales y la facilidad de manejo permitió que ambos aspectos fueran adecuados, lo que quizá pueda explicar esta respuesta.

b) Distribución de la frecuencia del estro.

El tiempo de respuesta promedio fue de 76 h para la primera aplicación de Pg y de 72 h para la segunda, mientras que para el implante fue de 31 h. Estos resultados están dentro del rango reportado en la literatura para la Pg (56 a 120 h) (Cooper, 1974; Jhonson, 1978; Spitzer et al., 1981; Prather et al., 1984; Alvarez et al., 1991) y de 24 a 48 h para implantes de Norgestomet (Prather et al., 1984; King et al., 1986).

La distribución del tiempo de respuesta es más dispersa en la primera aplicación de Pg que en la segunda. Resultados similares fueron reportados por Cooper, (1974) y Jhonson (1978). Lo

anterior puede ser consecuencia de que los animales se encuentran en diferente estado del ciclo estral. Stevenson *et al.* (1984) demostraron que el día de la administración de la Pg es determinante en el tiempo de inicio del estro. Los animales están más compactados en su ciclo al momento de la segunda aplicación y responden en menos tiempo (Cooper, 1974; Jhonson, 1978). En el caso del implante, todos los animales respondieron antes de las 48 h, similar a los resultados reportados por King *et al.* (1986).

EXPERIMENTO II.

a) Incidencia del estro.

El porcentaje de animales que fue detectado en estro tanto en la primera (44%) como en la segunda (84%) y tercera (84%) aplicación de Pg coinciden con los reportes de la literatura (Cooper, 1974; Roche *et al.*, 1976; Burfening *et al.*, 1978; Johnson, 1978; Coleman *et al.*, 1987; Alvarez *et al.*, 1991), que reportan rangos de 40 a 70% para la primera aplicación y de 71 a 90% para la segunda aplicación.

b) Distribución de la frecuencia del estro.

El tiempo de respuesta promedio (96 y 49 h, para animales jóvenes y 68 y 59 h, para animales adultos) disminuyó de la primera a la tercera aplicación de Pg. Resultados similares fueron reportados por Cooper (1974) y Johnson (1978), quienes reportan una disminución del tiempo de respuesta de 68 a 57 h de la primera a la tercera aplicación de Pg.

La distribución del tiempo de respuesta es más dispersa en la primera aplicación con respecto a la segunda y tercera. Sin embargo, aún entre las dos últimas aplicaciones la distribución es diferente, a pesar de que los animales están más compactados en su ciclo (Stevenson *et al.*, 1984). Lo anterior posiblemente se debe a diferencias en el estado folicular al momento de la luteólisis, esto es si existe o no un folículo dominante y el grado de desarrollo en que éste se encuentre, cuya aparición varía entre animales con 2 ó 3 ondas foliculares (Ghinter *et al.*, 1989b; Ko *et al.*, 1991; Lavoit y Fortune, 1990; Fortune, 1993; Twagiramungu *et al.*, 1994).

En nuestro experimento el porcentaje de animales factible de ser utilizado como receptoras fue del 64%, superior al 53% reportado por Munar y Nigro (1986), quienes recomiendan sincronizar el doble de las receptoras requeridas.

EXPERIMENTO III.

a) Incidencia del estro.

El porcentaje de animales (87%) que respondió al tratamiento es similar a los reportes de Spitzer *et al.* (1981), Prather *et al.* (1984), Moyaerth *et al.* (1987), y Odde (1990), quienes reportan rangos de respuesta de 77 a 100%.

b) Distribución de la frecuencia del estro.

El tiempo de respuesta tanto en animales jóvenes (34 h) como en animales adultos (38 h) fue similar a los reportes de la literatura (González *et al.*, 1984; King *et al.*, 1986). La distribución del tiempo de respuesta se concentró entre las 24 y 48 h posteriores a la remoción del implante, resultados similares fueron reportados por King *et al.* (1986).

El porcentaje de animales que responden al tratamiento de sincronización del estro, sirve para inferir el número de animales factibles de ser utilizados como receptoras, de manera que sea tomado como criterio al momento de definir el número de animales que deben entrar al tratamiento de sincronización del estro.

El tiempo de respuesta, así como la distribución de la frecuencia del estro, deben tomarse en cuenta al diseñar el programa de sincronización. Dicha información permite predecir las horas de respuesta con la finalidad de obtener un mayor grado de sincronización del estro entre donadoras y receptoras, lo cual es determinante en la tasa de gestación posterior a la transferencia de embriones.

Los resultados de nuestros experimentos indican una mejor respuesta al utilizar implantes de Norgestomet, a pesar de que no fueron comparados los dos métodos de sincronización, lo cual puede ser un comportamiento inherente a la raza. En base a los resultados obtenidos se recomienda utilizar este método de sincronización en trabajos donde se incluyan animales con características similares a las de los animales de los presentes estudios.

RESPUESTA SUPEROVULATORIA.

Efecto de edad.

La edad de la donadora no tuvo efecto sobre la tasa ovulatoria, producción de embriones totales ni embriones transferibles (Experimentos I y II). Resultados similares fueron reportados

por Hasler (1980), Hasler et al. (1983), Donaldson (1984), Romero et al. (1991) y Hahn (1992) quienes no encontraron diferencias entre edades. Los resultados son contrarios a lo reportado por Lerner et al. (1986) y Breuel et al. (1991), quienes mencionan que existe una disminución en la respuesta ovulatoria al aumentar la edad, debido a una disminución en el número de folículos en los ovarios.

Los resultados de nuestros experimentos indican la factibilidad de implementar tratamientos superovulatorios a edades tempranas, lo cual permitiría la reproducción intensiva de animales genéticamente superiores, sin la necesidad de esperar a que sean adultos.

Presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio.

La tasa ovulatoria fue similar (5.3 vs. 8.7) en animales con presencia o ausencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio. El número de embriones totales y embriones transferibles fue significativamente menor en los animales que presentaron un folículo dominante. Resultados similares fueron reportados por Grasso et al. (1989), Roullier et al. (1990), Guilbault et al. (1991), Hahn (1992), Huhtinen (1992), Bungartz y Niemann (1994), Wehrman et al. (1994) quienes reportan una disminución en la producción de embriones totales, embriones transferibles así como en la tasa ovulatoria, cuando existe un folículo dominante el día de inicio del tratamiento superovulatorio. En nuestro caso aunque la tasa ovulatoria fue similar, se observa la misma tendencia.

Los resultados anteriores quizá se deben a que los animales con un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio,

presentan un transporte anormal de gametos y embriones, baja tasa de fertilización, baja tasa de recuperación (Grasso *et al.*, 1989; Gray *et al.*, 1992; Bungartz y Niemann, 1994). Además, de que el folículo dominante inhibe el crecimiento de los folículos más pequeños a través de la secreción de algunas hormonas y algunos promotores o inhibidores de crecimiento (Irland y Roche, 1986; Roullier *et al.*, 1990; Driancourt, 1991; Adams *et al.*, 1992; Dereck *et al.*, 1992; Fortune, 1993; Savio *et al.*, 1993; Lussier *et al.*, 1994; Sunderland *et al.*, 1994; Wehrman *et al.*, 1994).

Presencia de un folículo dominante el día 10 del ciclo estral.

El ciclo estral en el bovino consta de 2 ó 3 ondas foliculares, que culminan con un folículo dominante. En animales con 3 ondas, estas inician en promedio los días 2, 9 y 16, mientras que animales con 2 ondas foliculares inician en los días 2 y 11 del ciclo estral (Ghinter *et al.*, 1989c; Boland *et al.*, 1990; Fortune, 1993; García y Bo, 1993).

Lo anterior podría explicar los resultados obtenidos en el experimento I, donde algunos animales presentan un folículo dominante el día 10 del ciclo estral y otros no. Posiblemente algunos animales experimenten 2 ondas y otros 3. Algunos otros aspectos que pueden ayudar para determinar si el ciclo es 2 ó 3 ondas foliculares son, la amplitud del ciclo, amplitud de la fase luteal, tamaño del primer folículo dominante, número de folículos pequeños (3-8 mm) en presencia de un folículo grande (Ghinter *et al.*, 1989a; Gray *et al.*, 1992; Fortune, 1993; Bungartz y Niemann, 1994).

El seguimiento por ultrasonografía de la dinámica folicular durante el ciclo o por lo menos 4 días antes de iniciar el tratamiento superovulatorio, así como el conocimiento de la amplitud del ciclo y su fase luteal, tamaño del primer folículo dominante, nos puede ayudar en el diseño de tratamientos superovulatorios adecuados para cada caso, e iniciar el tratamiento antes que inicie la fase de dominancia folicular (Gray et al., 1992; Huhtinen, 1992; García et al., 1993; Fortune, 1993).

El inicio del tratamiento superovulatorio en ausencia de un folículo dominante produce una mejor respuesta ovulatoria (Hahn, 1992; Huhtinen, 1992). Existen algunas metodologías tanto hormonales como físicas para eliminar el folículo dominante antes de iniciar el tratamiento superovulatorio. Sin embargo, los resultados no son convincentes (Armstrong, 1993).

La sincronización del estro también puede ser mejorada, pues el tiempo de respuesta depende del estado de desarrollo del folículo dominante en el momento en que ocurra la luteólisis, lo cual varía si el animal tiene 2 ó 3 ondas foliculares (Ghinter et al., 1989b; Guilbault et al., 1990; Fortune, 1993; Mihm et al., 1994; Twagiramungu et al., 1994).

Concentración de progesterona.

La concentración de progesterona al iniciar el tratamiento superovulatorio no tuvo relación con la tasa ovulatoria. Resultados similares fueron reportados por Saumande (1980), Greve et al. (1983), Thomas (1988) y García et al. (1993). La concentración de progesterona al momento de la recuperación de embriones tuvo una correlación alta con la tasa ovulatoria, lo cual coincide con otros autores (Saumande, 1980; Donaldson,

1985; Saumande *et al.*, 1985). Sin embargo, dicha relación no está asociada con la producción de embriones (Donaldson, 1985; Saumande *et al.*, 1985; Armstrong, 1993).

La concentración de progesterona ha sido recomendada como una herramienta para predecir la respuesta de animales sometidos a tratamientos de superovulación (Thomas, 1988; Callesen *et al.*, 1989). La concentración de progesterona al momento del estro no fue determinada en nuestros experimentos. Sin embargo, también es importante pues animales que presentan concentraciones elevadas al momento del estro producen embriones de baja calidad (Saumande, 1980; Mikel-Jenson *et al.*, 1982), lo cual posiblemente se deba a alteraciones en el proceso de capacitación y transporte de los espermatozoides (García *et al.*, 1993).

Recuperación de embriones.

La diferencia en la tasa de recuperación de embriones de los animales adultos y jóvenes (56 vs. 52.7%, para el experimento y I y 62.3 vs. 56.5%, para el experimento III) no fue significativa. Sin embargo, fue consistentemente superior en animales adultos, lo cual coincide con Hasler (1980) y Hasler *et al.* (1983), pero no con Romero *et al.* (1991), quienes reportan una tasa de recuperación de embriones mayor en animales jóvenes. En nuestro caso quizá se deba a problemas en el lavado debido a la dificultad para pasar el cervix en los animales jóvenes.

La tasa de recuperación de embriones es un indicador de la eficiencia de la técnica, no obstante se debe considerar que la estimación de la respuesta por palpación rectal puede ser inexacta, pues aproximadamente el 60% de los cuerpos lúteos son identificados en forma apropiada (Donaldson, 1985). Por otro lado la captura de los óvulos por la fimbria puede fallar debido al tamaño del ovario, algunos óvulos quedan atrapados en los folículos luteinizados (Donaldson, 1991), además de que entre el 9 y 13% de los animales no producen embriones a pesar de tener buena respuesta (Greve, 1986).

Algunos animales presentan regresión prematura de cuerpo lúteo, lo cual ha sido asociado con una recuperación de un número reducido de embriones y además de baja calidad (Betteridge et al., 1981/1982; Mikel-Jensen et al., 1982).

EFFECTO DE EDAD SOBRE LA TASA DE GESTACION.

La edad de la receptora no tuvo efecto significativo sobre la tasa de gestación posterior a la transferencia. Sin embargo, en el experimento III los animales jóvenes tuvieron una tasa de gestación mayor que los animales adultos (71 vs. 50%). Resultados similares (79 vs. 61%) fueron reportados por Webb y Hasler (1988). Broadbent (1991) y Thibier y Nibart (1992) reportan el mismo comportamiento.

Los resultados anteriores quizá se deban a que el útero de las vaquillas es más adecuado para alojar el embrión transferido. Además las vaquillas no están bajo estrés lactacional y las vacas pueden estar recuperándose de la lactación y el anestro postparto (Broadbent, 1991; Thibier y Nibart, 1992).

Los resultados sugieren la posibilidad de utilizar animales jóvenes como receptoras de embriones con buenos resultados. Adicionalmente las vaquillas tienen un menor costo, menor demanda de espacio y alimentación, requieren menos manejo y no se interfiere con el proceso productivo de la explotación como sería el caso al utilizar vacas que están criando o lactando.

Algunas limitantes al utilizar vaquillas incluyen, la dificultad para pasar el cervix, problemas al parto y freemartinismo (Broadbent, 1991). Sin embargo, dichas limitantes pueden ser superadas al llevar a cabo la selección de receptoras. Por lo que es necesario realizar un examen completo del tracto reproductivo, así como la facilidad de pasar el cervix y seleccionar animales grandes si la raza de la donadora es de talla grande y minimizar así el riesgo de partos distócicos.

RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE PROGESTERONA EN SUERO AL MOMENTO DE LA TRANSFERENCIA Y LA TASA DE GESTACION.

La concentración de progesterona en suero al momento de la transferencia, fue similar entre los animales que quedaron gestantes y los animales vacíos (1.26 vs. 1.06 ng/ml en el experimento II y 0.76 vs. 0.48 ng/ml en el experimento III). Resultados similares han sido reportados por Hasler et al. (1980), Niemann et al. (1985), Stubbings y Walton (1986), Payas et al. (1989) y Gastelum et al. (1992). Por otro lado, Remsen y Roussel (1982) y Northey et al. (1985), reportaron niveles de progesterona significativamente superiores en animales gestantes comparativamente con los vacíos.

La mayoría de los autores reportan niveles óptimos de progesterona (2-5 ng/ml) el día de la transferencia, de tal manera que animales con niveles fuera del rango indicado es difícil que queden gestantes.

En nuestros experimentos algunos animales tuvieron una concentración de progesterona <1 ng/ml y su tasa de gestación fue menor que los animales que tuvieron una concentración de progesterona >1 ng/ml (14 vs. 44 % en el experimento II y 57 vs. 80% en el experimento III). Esto es importante, pues cuando existe un cuerpo lúteo funcional la concentración de progesterona es >1 ng/ml (Alvarez et al., 1991), en nuestro caso puede ser una característica inherente a la raza. Concentraciones de progesterona inferiores a 1 ng/ml el día 7 del ciclo estral han sido reportadas por Reed et al. (1985). Adicionalmente, Hasler et al. (1980) encontraron tasas de gestación bajas en receptoras con una concentración <1 ng/ml.

La concentración de progesterona al momento de la transferencia y su relación con la tasa de gestación puede ser utilizada para identificar las receptoras que posiblemente no queden gestantes y puedan ser reutilizadas (Remsen y Roussel, 1982; Northey et al., 1985). Sin embargo, en nuestros experimentos dicha relación no pudo ser demostrada, por lo tanto en nuestras condiciones la concentración de progesterona al momento de la transferencia no es un indicador que pueda ayudar a identificar receptoras que potencialmente puedan quedar gestantes.

CONCLUSIONES

La edad de la donadora no tuvo efecto sobre la respuesta a la superovulación.

La presencia de un folículo dominante al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio, provoca una disminución en la producción de embriones totales, embriones transferibles.

La concentración de progesterona al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio, no tiene relación con la tasa ovulatoria.

La edad de la receptora no tuvo un efecto significativo sobre la tasa de gestación. Sin embargo, los animales jóvenes tuvieron un mejor comportamiento.

La concentración de progesterona al día de la transferencia no es un buen indicador de los animales que potencialmente pueden quedar cargados.

LITERATURA CITADA

- Adams, G. P., Matteri, R. L. Kastelic, J. P., Ko, J. C. H. and Ghinter, O. J. 1992. Association between surges of follicle- stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J. Reprod. Fert. 94:177-188.
- Alvarez, R. H., Meirelles, C. F., Ambrosano, G. M. B., Oliveira, J. V. and Pozzi, J. R. 1991. The use of lower doses of the prostaglandin analogue, cloprostenol, for oestrus synchronization in heifers. Anim. Reprod. Sci. 25:93-96.
- Amstrong, D. T. 1993. Recent avances in superovulation of cattle. Therigenology 39:7-24.
- Ashworth, Ch. J. 1992. Synchrony embryo-uterus. Anim. Reprod. Sci. 28:259-267.
- Bazer, F. W., Vallet, J. L., Roberts, R. M., Sharp, D. C. and Thatcher, W. W. 1986. Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy J. Reprod. Fert. 76:841-850.

- Betteridge, K. J., Sudgen, E. A., Eaglesome, M. D., Randall, G. C. B., Mitchell, D. 1981/1982. Plasma progesterone levels in superovulated cattle in relation to hatched embryo size, ovulation rates and premature regression of corpora lutea. Anim. Reprod. Sci. 4:207-212.
- Bielanski, A. and Yadav, B. R. 1990. A note on fertilization and embryo production in superovulated cattle with various levels of subcutaneous fat tissue. Anim. Prod. 51:426-430.
- Boland, M. P., Goulding, D. and Roche, J. F. 1991. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. Theriogenology 35:5-15.
- Boland, M. P., Murphy, M. C. and Roche, J. F. 1990. The use of ultrasound to monitor ovarian function in farm animals. Agbiotech. News and Information 2:841-844.
- Breuel, K. F., Baker, R. D., Butcher, R. L., Townsend, E. C., Inskeep, E. K., Dailey, R. A. and Lerner, S. P. 1991. Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. Theriogenology 36:241-255.
- Broadbent, P. J., Stewart, M. and Dolman, D. F. 1991. Recipient management and embryo transfer. Theriogenology 35: 135-139.

- Bungartz, L. and Niemann, H. 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows for superovulation by a simple ultrasound examination. J. Reprod. Fert. 101:583-591.
- Burfening, P. J. Anderson, D. C., Kinkie, R. A., Williams, J. and Friedrich, R. L. 1978. Synchronization of estrus with $\text{PGF}_2\mu$ in beef cattle. J. Anim. Sci. 47:999-1003.
- Callesen, H., Bak, A., Greve, T., Avery, B., Golgredsen, P., Holm, P., Hyttel, P., Penderson, J. O., Schidmit, M., Smith, S. and Suanborg, N. 1989. Hormonal parameters for evaluation of superovulated heifers. Theriogenology 31:180. (Abstr).
- Church, R. B. and Shea, B. 1976. Some aspects of bovine embryo transfer. In: Rowson, L. E. A. (Ed.) Seminar on egg transfer in cattle in the EEC programme of coordination of research on beef production. Agricultural Research. Council. Cambridge. p. 72-93.
- Christie, W. B., Newcomb, R. and Rowson, L. E. A. 1980. Non-surgical transfer of bovine eggs: Investigation of some factors affecting embryo survival. Vet. Rec. 106:190-193.

- Confederación Nacional Ganadera, 1993. Información económica pecuaria. Dirección de Estudios Económicos y Comercio Internacional. México. 64 p.
- Coleman, D. A., Dailey, R. A., Lefflel, R. E. and Baker, R. D. 1987. Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. J. Dairy. Sci. 70:858- 866.
- Cooper, M. J. 1974. Control of oestrus cycles of heifers with a synthetic prostaglandin analogue. Vet. Rec. 95:200-203.
- Crister, J. K., Rowe, R. F., Del Campo, M. R. and Ginther. O. J. 1980. Embryo transfer in cattle: Factors affecting superovulatory response, number of transferable embryos, and length of post-treatment estrous cycles. Therigenology 13:397-406.
- Curtis, J. L. 1990. Cattle Embryo Transfer Procedure. United States of America. 130 p.
- Demoulin, A., Henderson, K. M. and Franchimont, P. 1986. Inhibin and ovarian function. In: Roche, J. F. and O'Callagan, D. (eds). Follicular growth and ovulation rate in farm animals. Martinus Nijhoff, The Hague. p. 18-30.

- Dereck, K, L. and Dorrington, J. 1992. Intraovarian regulation of follicular development. *Anim. Reprod. Sci.* 28:343-354.
- Donaldson, L. E. 1984. Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology* 21:1013-1022.
- Donaldson, L. E. 1985. Estimation of superovulation response in donor cow. *Vet. Rec.* 117:33-34.
- Donaldson, L. E. 1991. Superovulation on trial. *Ausa. International, Inc.* Tyler. TX. USA. 20 p.
- Driancourt, M. A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35:55-79.
- Fogwell, R. L. 1988. Ovarian follicular growth in cattle: Physiology and pharmacology. *Proceeding of the 7th Annual Convention. American Embryo Transfer Association.* Reno, Nevada. USA. p. 119-130.
- Fortune, J. E. 1993. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 33:111-125.
- García, A. y Bo, G. A. 1993. Uso de la ultrasonografía para el estudio de los eventos reproductivos en el bovino. XVIII Congreso Nacional de Buiatría. México. D. F. p. 152-160.

- García, A., Mapletoft, R. J. y Bo, G. A. 1993. Nuevos avances en superovulación en bovinos: Consideraciones prácticas. Congreso Nacional de Buiatría. D. F. México. p. 161-177.
- García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. U.N.A.M. México. 252 p.
- Gastelum, P., Villa, A. G., Montaña, M. B., Zapien, A. S., Aspron, A. M. P. y Avila U. F. 1992. Efecto de la época del año sobre la reproducción de vacas y vaquillas receptoras de embriones en zonas áridas. En: Reunión nacional de investigación pecuaria. Chihuahua. México. p. 239 (Resumen).
- Ghinter, J. O., Kastelic, J. P. and Knopf, L. 1989a. Intraovarian relationship among dominant and subordinate follicles and corpus luteum in heifers. Theriogenology 32:787-795.
- Ghinter, O. J., Kastelic, J. P., and Knof, L. 1989b. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. Anim. Reprod. Sci. 20:187-200.
- Ghinter, O. J., Knof, L. and Kastelic, J. P. 1989c. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. J. Reprod. Fert. 87:223-230.

- Godkin, A. M., Leslie, K. E., Wain, G. M. and Leslie, B. E. 1987. Factors affecting pregnancy rate following non-surgical transfer of frozen bovine embryos. Theriogenology 27:230 (Abstr.).
- González, R. F., Soto, B. E., Bohorquez, C. R. and Gonzalez S. C. 1984. Pregnancy rate in cross-breed recipients (Zebu * Dairy breeds) synchronized with Norgestomet. Theriogenology 21:235 (Abstr.).
- Grasso, F., Guilbault, L. A., Roy, G. L., Matton, P. and Lussier, J. G. 1989. The influence of the presence of a dominant follicle at the time of initiation of a superovulatory treatment on superovulatory responses in cattle. Theriogenology 31:199 (Abstr.).
- Gray, B. W., Cartee, R. E., Stringfellow, D. A., Ridell, M. G., Ridell, K. P. and Wright, J. C. 1992. The effects of FSH-priming and dominant follicular regression on the superovulatory response of cattle. Theriogenology. 37:631-639.
- Greve, T., Callesen, H. and Hyttel, P. 1983. Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. Nor. Vet. Med. 35:408-421.
- Greve, T. 1986. Practical aspects of embryo transplantation in cattle. Br. Vet. J. 142:228-232.

- Guilbault, L. A., Roy, G. L., Grasso, F., Menard, D. P. and Bousquet, D. 1988. Ovarian follicular dynamics in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle an utrasonographic approach. Theriogenology 29:257 (Abstr.).
- Guilbault, I. A., Grasso, F., Lussier, J. G., Roullier, P. and Matton, P. 1991. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of dominant follicle. J. Reprod. Fert. 91:81-89.
- Hahn, J. 1992. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. Theriogenology 38:269-275.
- Hasler, J. F., Bowen, R. A., Nelson, L. D. and Seidel, G. E. Jr. 1980. Serum progesterone concentration in cows receiving embryo transfer. J. Reprod. Fert. 58:71-78.
- Hasler, J. F., McCauley, A. D., Schermerhorn, E. C. and Foote, R. H. 1983. Superovulatory responses in Holstein cows. Theriogenology 19:83-99.
- Hasler, J. F., McCauley, W. F. and Foote, R. K. 1987. Effect of donor - recipient interaction on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. Theriogenology 27:129-168.

- Hasler, J. F., Brooke, G. P. and McCauley, A. D. 1980. The relationship between age and response to superovulation in holstein cows and heifers. *Theriogenology* 15:109 (Abstr.).
- Huhtinen, M., Rainio, V., Aalto, J., Bredbacka, P. and Maki-Tanila, R. 1992. Increased ovarian response in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology* 37:457-463.
- Humbolt, P., Perrin, J., Jeanguyot, N., Nibart, M. and Thibier, M. 1987. Effects of age and quality of thawed embryos, synchronization and corpus luteum function on pregnancy rates of bovine embryo recipients. *Theriogenology* 27:240 (Abstr.).
- Ireland, J. J. and Roche, J. F. 1986. Hypothesis regarding development of the follicle during a bovine estrous cycle. In: Roche, J. F. and O'Callagan, D. (eds). *Follicular growth and ovulation rate in farm animals*. Martinus Nijhoff, The Hague. p. 1-13.
- Johnson, C. T. 1978. Time to onset of oestrus after the injection of heifers with cloprostenol. *Vet. Rec.* 103:204-206.
- Jillella, D. 1982. Embryo transfer technology and its application in developing countries. Monografía. Depto. Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 49 p.

- King, K. K., Seidel, G. E. Jr. and Elsdon, R. P. 1985. Bovine embryo transfer pregnancies: Abortion rates and characteristic of calves. J. Anim. Sci. 61:747-757.
- King, M. E., Odde, K. G., LeFever, D. G., Brown, L. N. and Neubauer, C. J. 1986. Synchronization of estrus in embryo transfer recipients receiving demi-embryos with Syncromate-B or Estrumate. Theriogenology 26:221-229.
- Ko, J. C. H., Kastelic, J. P., Del Campo, M. R. and Ghinter, O. J. 1991. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. J. Reprod. Fert. 91:511-519.
- Lavoie, M. and Fortune, J. E. 1990. Follicular dynamics in heifers after injection of $\text{PGF}_{2\mu}$ during the first wave of follicular development. Theriogenology 33:270 (Abstr.).
- Lerner, S. P., Thaynr, W. V., Baker, R. D., Hensche, T., Meredith, S., Inskeep, E. K., Dailey, R. A., Lewis, P. E. and Butcher, R. L. 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. J. Anim. Sci. 63:176-183.
- Lindner, G. M. and Wright, R. W. Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology 20:407-416.

- Lindsell, C. E., Murphy, B. D. and Mapletoft, R. J. 1986. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-p at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 26:209-219.
- Looney, C. R., Bondioli, K. R., Roach, R. T., Oden, A. J. and Massey, J. M. 1985. Prostaglandin $F_{2\mu}$ ($PGF_{2\mu}$) treatments for luteal regression in superovulation regimens of donor cattle. *Theriogenology* 23:206 (Abstr.).
- Lowman, B. C. 1985. Feeding in relation to sucker cow and fertility. *Vet. Rec.* 117:80-85.
- Lussier, J. G., Matton, P., Guilbault, L. A., Grasso, F., Mapletoft, R. J. and Carruthers. 1994. Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular-fluid-treated and hemiovariectomized heifers. *J. Reprod. Fert.* 102:95-105
- Mapletoft, R. J., Lindsell, P. E. and Pawlyshing, V. 1986. Effect of clenbuterol, body condition, and non surgical embryo transfer equipment on pregnancy rates in bovine recipients. *Theriogenolgy* 25:172 (Abstr.).
- Markette, K. L., Seidel, G. E. Jr. and Elsdon, R. P. 1985. Estimation of embryonic losses in bovine embryo transfer recipients from progesterone profiles and returns to oestrus. *Therigenology* 23:45 (Abstr.).

- Maurer, R. R. and Echternkamp, S. E. 1982. Hormonal asynchrony and embryonic development. *Therigenology* 17:11-23.
- Mihm, M., Baguisi, A., Boland, M. P. and Roche, J. F. 1994. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J. Reprod. Fert.* 102: 123-130.
- Mikel-Jenson, A., Greve, T., Madej, A. and Edquist, E. E. 1982. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF treated cow. *Therigenology* 18:33-34.
- Moyaert, I., Gielen, J. Th., Coryn, M. and Vandeplasseche, M. 1987. Estrus synchronization with Syncromate-B or Prostaglandins in recipients for embryo transfer. *Therigenology* 27:260 (Abstr.).
- Munar, C. J. and Nigro, M. A. 1986. Distribution of estrus, interpretation of ovarian findings and cervical patency in bovine recipients synchronized with a $\text{PGF}_{2\mu}$ analog (Delprostenate). *Therigenology* 25:175 (Abstr.).
- Niemann, H., Sacher, B. and Elsaesser, E. 1985. Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of surgical transfer of frozen/thawed bovine embryos. *Therigenology* 23:631-639.

- Niemann, H. 1990. Cryopreservation of bovine embryos in the field. Embryo Transfer Newsletter 8:5-7.
- Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. Theriogenology 35:109-124.
- Northey, D. L., Barnes, F. L., Eyestone, W. H. and First, N. L. 1985. Relationship of serum progesterone, luteinizing hormone and the incidence of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. Theriogenology 23:214 (Abstr.).
- Odde, K. G. 1990. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. J. Anim. Sci. 68:817-830.
- O'Gorman, J., Smith, F. H., Poole, D. B. R., Boland, M. P. and Roche, J. F. 1987. The effect of molybdenum-induced copper deficiency on production in beef heifers. Theriogenology 27:265 (Abstr.).
- Payas, A. J., Broadbent, P. J., Dolman, D. F. and Christie, B. W. 1989. Factors affecting pregnancy rate in embryo transfer recipients with reference to plasma progesterone. Theriogenology. 31:238 (Abstr.).
- Peters, A. R. and Ball, P. J. H. 1987. Reproduction in cattle. Butterworth. England. 191 p.

- Pettit, W. H. Jr. 1985. Commercial freezing of bovine embryos in glass ampules. *Theriogenology* 23:13-16.
- Prather, R. S., Spire, M. F. and Schalles, R. R. 1984. Norgestomet incorporation into superovulation regime. *Theriogenology* 21:256 (Abstr.).
- Reed, M. L., Roussel, J. D. and Seybt S. H. 1985. Repeatibility of blood serum progesterone levels in dairy heifers on day 7 of the estrous cycle. *Therigenology* 24:643-646.
- Remsen, L. G., Roussel, J. D. and Karihalco, A. K. 1982. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in heifers at day o f transfer. *Theriogenology* 18:365-372.
- Roche, J. F. 1976. Fertility in cows after treatment with a prostaglandin analogue with or without progesterone. *J. Reprod. Fert.* 46:341-345.
- Roffey, D. 1989. Selenium supplementation can produce higher quality embryos for transfer. *Embryo Transfer Newsletter* 4:4-5.
- Romero, A., Albert, J., Brink, Z. and Seidel, G. E. Jr. 1991. Numbers of small follicles in ovaries affects superovualation response in cattle. *Theriogenology* 35:265 (Abstr.).

- Roullier, P., Matton, P., Guilbault, L., Grasso, F. and Lussier, J. 1990. Influence of a dominant follicle atresia and estradiol release by ovarian follicles during superovulation in cattle. *Therigenology* 33:313 (Abstr.).
- SAS. 1985. SAS, User'S Guide: Statistic. SAS Inst., Inc., Cary, NC. 1292 p.
- Saumande, J. 1980. Concentration of luteinizing hormone oestradiol 17 β and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. *J. Endocrinol.* 84:425-437.
- Saumande, J., Tamboura, D. and Chupin, D. 1985. Changes in milk and plasma concentration of progesterone in cows after treatment to induce superovulation and their relationships with number of ovulation and embryo collected. *Therigenology* 23:719-731.
- Savio, J. D., Thatcher, W. W., Badinga, L., de la Sota. R. L. and Wolfenson, D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrus cycle in cows. *J. Reprod. Fert.* 97:197-203.
- Sirois, J. Fortune, J. E. 1990. Monitoring ovarian follicular development in cattle by ultrasound imaging. *Embryo Transfer Newsletter* 8:9-16.

- Seidel, G. E. Jr. and Elsdon, R. P. 1989. Embryo transfer in dairy cattle. W. D. Hoard and Sons Company. USA . 101 p.
- Seidel, G. E. Jr. and Moore, S. S. 1991. Training manual for embryo transfer in cattle. FAO Animal productive and health paper. FAO. Rome. 165 p.
- Short, R. E. and Adams, D. C. 1988. Nutritional and hormonal interrelationship in beef cattle reproduction. Can. J. Anim. Sci. 68:29-39.
- Spitzer, J. C., Mares, S. E. and Peterson, L. A. 1981. Pregnancy rate among beef heifers from timed insemination following synchronzation with a progestin treatment. J. Anim. Sci. 53:1-6.
- Sreenan, J. M. and Diskin, M. G. 1987. Factors affecting pregnancy rates following embryo transfer in the cow. Theriogenology 27:99-113.
- Srikandakumar, A., Ingraham, R. H., Ellsworth, M., Archbald, L. F., Liao, A. and Godke, . 1986. Comparison of a solid- phase, no extraction radioimmunoassay for progesterone with on extraction assay, for monitoring luteal function in the mare, bitch and cow. Theriogenology 26:779-793.

- Stevenson, J. S., Schmidt, M. K. and Call. E. P. 1984. Stage of -estrous cycle, time of insemination, and seasonal effects on estrus and fertility of holstein heifers after prostaglandin $\text{PGF}_2\mu$. J. Dairy. Sci. 67:1798-1805.
- Stubbings, R. B. and Walton J. S. 1986. Relationship between plasma progesterone concentrations and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or previously frozen embryos. Theriogenology 26:145-155.
- Sunderland, S. J., Crowe, M. A., Boland, M. P., Roche, J. F. and Ireland, J. J. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. J. Reprod. Fert. 101:547-555.
- Thibier, M. and Nibart, M. 1992. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. Anim. Reprod. Sci. 28: 139-148.
- Thomas, M. 1988. Investigations on the selection of donor cows for embryo transfer with regard to preliminary report and blood parameters. Thesis Dr. Med. Vet. Tierarztliche hochschule, Hannover. Germany. 155 p.
- Thompson, F. N., Clekis, T., Kiser, T. E., Chen, H. J. and Smith, Ch. K. 1980. Serum progesterone concentrations in pregnant and nonpregnant heifers and after gonadotropin releasing hormone in luteal fase heifers. Therigenology 13:407-417.

- Totey, S. M., Singh, G. and Talwar, G. P. 1989. Superovulatory response in lactating *Bos indicus* x *Bos taurus* cows primed with FSH-p at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology* 31:268 (Abstr.).
- Touati, K., Van Der Zwalm, P., Ectors, F. J., Beckers, J. F. and Ectors, F. 1989. Low dose of FSH-p early in estrous cycle enhances superovulatory response in heifers. *Theriogenology* 31:269 (Abstr.).
- Touati, K., Beckers, J. F. and Ectors, F. 1991. Hormonal control of folliculogenesis in the bovine: Better superovulatory response after pure FSH administration preceding the classical treatment. *Theriogenology* 32:285 (Abstr.).
- Twagiramungu, H., Guilbault, L. A., Proulx, J. G. and Duffour, J. J. 1994. Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian dynamics in postpartum cyclic cows treated with buserelin and cloprostenol. *J. Anim. Sci.* 72:1796-1805.
- Ware, C. B., Northey, D. L., Boland, M. P. and First, N. L. 1988. Early cycle FSH-Priming as a prelude to superovulating gonadotropin administration in ewes and heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 16:97-105.

Webb, J. and Hasler, J. F. 1988. The pregnancy rate in recipient cow and heifers following non-surgical transfer of embryos. Proceeding of the 7th Annual Convention. American Embryo Transfer Association. Reno, Nevada. USA. p. 106-109.

Wehrman, M. E., Bergfeld, E. G., Cupp, A. S., Kojima, F. N., Peters, K. E., Mariscal, V., Sanchez, T., Kittok, R. J. and Kinder, J. E. 1994. Development of a persistent ovarian follicle influences response to superovulation in heifers. Theriogenology 41:332 (Abstr.).

Wilson, M. J. 1988. Superovulation: FSH update In: Proceeding of the 7th annual convention. American Embryo Transfer Association. Reno. Nevada. E. U. A. p. 31-43.

Wright, J. M. 1985. Commercial freezing of bovine embryos in straws. Theriogenology 23:17-29.

APENDICES

Apéndice 1. Prueba de Bartlett de homogeneidad de varianzas para el experimento I

Característica	Chi ²	Prob.
Efecto de edad sobre tasa ovulatoria	0.966	0.32568
Efecto de edad sobre producción de embriones totales	0.64	0.42371
Efecto de edad sobre producción de embriones transferibles	0.142	0.70630
Efecto de edad sobre tasa de recuperación	0.001	0.97477
Folículo dominante sobre tasa ovulatoria	0.405	0.52452
Folículo dominante sobre sobre la producción de embriones totales	1.169	0.27961

Apéndice 2. Prueba de Bartlett de homogeneidad de varianzas
para el experimento III

Característica	Chi ²	Prob.
Efecto de edad sobre tasa ovulatoria	1.435	0.23095
Efecto de edad sobre producción de embriones totales	2.504	0.11336
Efecto de edad sobre producción de embriones transferibles	2.906	0.08825
Efecto de edad sobre tasa de recuperación	1.502	0.21975

Apéndice 3. Análisis de varianza de efecto de edad
sobre embriones totales en el experimento I

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F	Prob
Edad	1	1.87	1.87	1.12	0.32
Error	6	10.00	1.66		
Total	7	11.87			

Apéndice 4. Análisis de varianza de efecto de edad sobre tasa ovulatoria en el experimento I

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F	Prob
Edad	1	1.66	1.66	0.08	0.78
Error	8	174.83	21.85		
Total	9	176.50			

Apéndice 5. Análisis de varianza de efecto de edad sobre la producción de embriones transferibles en el experimento I

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F	Prob
Edad	1	0.41	0.41	0.10	0.7555
Error	8	32.08	4.01		
Total	9	32.50			

Apéndice 6. Análisis de varianza de efecto de edad sobre tasa de recuperación de embriones en el experimento I

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F	Prob
Edad	1	18.40	18.40	0.01	0.9075
Error	6	7519.46	1253.24		
Total	7	7537.87			

Apéndice 7. Tabla de contingencia para la respuesta a la primera aplicación de Pg en el experimento II

Edad	Incidencia del estro	
	Si n (%)	No n (%)
Adulta	6 (46)	7 (54)
Joven	5 (42)	7 (58)

$$\text{Chi}^2 = 0.051 \quad P > 0.82133$$

Apéndice 8. Tabla de contingencia para la respuesta a la segunda aplicación de Pg en el experimento II

Edad	Incidencia del estro	
	Si n (%)	No n (%)
Adulta	10 (77)	3 (23)
Joven	11 (92)	1 (8)

$$\text{Chi}^2 = 1.054 \quad P > 0.305$$

Apéndice 9. Tabla de contingencia para la respuesta a la tercera aplicación de Pg en el experimento II

Edad	Incidencia del estro	
	Si n (%)	No n (%)
Adulta	10 (77)	3 (23)
Joven	11 (92)	1 (8)

$\chi^2 = 1.054$ $P > 0.305$

Apéndice 10. Tabla de contingencia para efecto de edad sobre tasa de gestación en el experimento II

Edad	Gestación	
	Si n (%)	No n (%)
Joven	2 (25)	6 (75)
Adulta	3 (38)	5 (62)

$\chi^2 = 0.292$ $P > 0.589$

Apéndice 11. Tabla de contingencia para concentración de progesterona sobre tasa de gestación en el experimento II

Concentración de progesterona	Gestación	
	Si n (%)	No n (%)
< 1 ng/ml	1 (14)	6 (86)
> 1ng /ml	4 (44)	5 (56)

$$\text{Chi}^2 = 1.768 \quad P > 0.184$$

Apéndice 12. Tabla de contingencia para efecto de edad sobre respuesta al implante de Norgestomet en el experimento III

Edad	Incidencia del estro	
	Si n (%)	No n (%)
Adulta	14 (78)	4 (22)
Joven	20 (95)	1 (5)

$$\text{Chi}^2 = 2.761 \quad P > 0.097$$

Apéndice 13. Análisis de varianza para efecto de edad sobre la producción de embriones totales en el experimento III

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F	Prob
Edad	1	36.75	36.75	4.49	0.1015
Error	4	32.75	8.18		
Total	5	69.50			

Apéndice 14. Análisis de varianza para efecto de edad sobre tasa ovulatoria en el experimento III

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F	Prob
Edad	1	15.12	15.12	0.69	0.4383
Error	6	131.75	21.95		
Total	7	146.87			

Apéndice 15. Análisis de varianza para efecto de edad sobre la producción de embriones transferibles en el experimento III

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F	Prob
Edad	1	3.04	3.04	0.12	0.7447
Error	5	128.66	25.73		
Total	6	131.71			

Apéndice 16. Análisis de varianza para efecto de edad sobre tasa de recuperación de embriones en el experimento III

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F	Prob
Edad	1	0.5995	0.5995	1.92	0.2147
Error	6	1.8693	0.3115		
Total	7	2.4688			

Apéndice 17. Tabla de contingencia para efecto edad sobre tasa de gestación en el experimento III

Edad	Gestación	
	Si n (%)	No n (%)
Adulta	6 (50)	6 (50)
Joven	10 (71)	4 (29)

$$\text{Chi}^2 = 1.259 \quad P > 0.262$$

Apéndice 18. Tabla de contingencia para concentración de progesterona y tasa de gestación en el experimento III

Concentración de progesterona	Gestación	
	Si n (%)	No n (%)
< 1 ng/ml	12 (57)	9 (43)
> 1ng /ml	4 (80)	1 (20)

$$\text{Chi}^2 = 0.960 \quad P > 0.327$$

Apéndice 19. Análisis de varianza para efecto de un
folículo dominante sobre la producción de
embriones totales en el experimento I

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F	Prob
Folículo	1	8.00	8.00	12.43	0.0124
Error	6	3.86	0.64		
Total	17	11.87			

Apéndice 20. Análisis de varianza para efecto de un
folículo dominante sobre la tasa ovulatoria en
el experimento I

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F	Prob
Folículo	1	28.01	28.01	1.72	0.2257
Error	8	130.08	16.26		
Total	9	158.10			

Apéndice 21. Análisis de varianza para efecto de un folículo dominante sobre la producción de embriones transferibles en el experimento I

Fuente	g.l.	S.C.	C.M.	F	Prob
Folículo	1	15.00	15.00	6.86	0.0307
Error	8	17.5	2.18		
Total	9	32.5			

Apéndice 22. Correlación entre la concentración de progesterona y la tasa ovulatoria

	Experimento	
	II	III
Concentración de progesterona al inicio de la superovulación (Probabilidad)	-0.28 (0.71)	-0.21 (0.60)
Concentración de progesterona al recolectar los embriones (Probabilidad)	0.22 (0.77)	0.85716 (0.01)