

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



**RESPUESTA SUPEROVULATORIA ASOCIADA A LOS
NIVELES DE HORMONA ANTIMULLERIANA EN VACAS
DONADORAS**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA

M.V.Z CITLALI PEÑA CALDERON

DIRECTOR DE TESIS

DR. ABELARDO CORREA CALDERÓN

EJIDO NUEVO LEÓN, MEXICALI, BAJA CALIFORNIA. NOVIEMBRE 2015

La presente tesis titulada “RESPUESTA SUPEROVULATORIA ASOCIADA A LOS NIVELES DE HORMONA ANTIMULLERIANA EN VACAS DONADORAS”, realizada por la C. Citlali Peña Calderón, fue dirigida por el Dr. Abelardo Correa Calderón siendo aceptada, revisada y aprobada por el Consejo Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Consejo Particular

Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California.

Ph. D. Abelardo Correa Calderón

Director de Tesis

Ph. D. Pablo Luna Nevárez

Secretario

Ph. D. Leonel Avendaño Reyes

Sinodal

Dr. Ulises Macías Cruz

Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por todas las bendiciones.

Al Instituto de Ciencias Agrícolas, perteneciente a UABC, por la formación académica para la realización de este proyecto, así como a el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención otorgada durante mi estancia en este Instituto. Agradezco también al Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) por la colaboración brindada para poder realizar este proyecto.

Especialmente deseo agradecer a mis asesores principales, PhD. Abelardo Correa Calderón y PhD. Pablo Luna Nevárez, a quienes debo mi interés por la investigación. Mil gracias por su apoyo, dedicación, consideración, disponibilidad y aprecio mostrado hacia a mi persona. También a todo el cuerpo académico de Fisiología y Genética animal, M.C. Fco. Daniel Álvarez Valenzuela, M.C.J. Salome Saucedo Quintero, Dra. Noemí Guadalupe Torrentera Olivera, Dra. Silvia Mónica Avilés Marín. Al PhD. Leonel Avendaño Reyes en especial por su orientación principalmente en todo lo que conlleva al área estadística, al Dr. Ulises Macías Cruz gracias por los conocimientos brindados y sobre todo por exigirnos dar lo mejor de nosotros. Gracias a todos por hacerme sentir en familia.

Mi más sincero agradecimiento al M.C. José Florentino Torres Simental, Director del Centro de Mejoramiento Genético del Estado de Sonora (CEMEGES), porque sin su apoyo no lo hubiera logrado.

A mis compañeros y amigos, Teresita Sánchez, Gustavo Oroz, Martin Cisneros, Ricardo Zamorano, Ismael Angulo, Miguel Gastelum, Jorge Betancourth, Bill Gutiérrez, Eudor Montoya, Lizbeth Moreno, Ángel Mejía, Ricardo Pérez, Filiberto Anzures, Yolanda Osorio, Fernanda Antonarez y muchos más. Gracias por brindarme su ayuda, amistad y por tantos momentos maravillosos que pasamos juntos, les deseo todo el éxito del mundo.

DEDICATORIAS

A mi familia, muy especialmente a mi nana María Luisa Molina, mis padres Martin Peña y Hortencia Calderón. No encuentro palabras para expresar la admiración, respeto y amor que siento por ustedes. Siempre me han apoyado en todos los sentidos, porque me enseñaron que el amor es trabajo, entrega, dedicación y ejemplo. A mis hermanos Luis Daniel y Oscar Peña, gracias por su cariño y apoyo, pero sobre todo por las peleas y entrenamientos infantiles, sin ello todo hubiese resultado más difícil. A mi hermana Diana Armenta a quien Dios puso en mi camino, hace 8 años, la vida me dio la oportunidad de conocerte, el destino nos hizo amigas pero nuestro corazón nos hizo hermanas, sé que siempre estaremos juntas a pesar de las distancias. A mis tíos y primos que han sido siempre un pilar esencial en mi formación profesional ¡Simplemente los amo!

A Edgar Cabrera Orozco, gracias por alentarme cada día y por creer en mí inclusive cuando ni yo misma lo hacía, por compartir tu vida y tu familia. Te amo.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIAS	vi
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 SITUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CARNE Y LECHE DE BOVINO	3
2.1.1 Factores que afectan la producción.....	4
2.2 CICLO ESTRAL DEL BOVINO	4
2.2.1 Etapas del ciclo estral.....	5
2.2.2 Dinámica folicular	6
2.3 BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS	7
2.3.1 Manipulación del ciclo estral.....	7
2.3.2 Inseminación artificial	7
2.3.3 Superovulación.....	8
2.3.4 Factores que alteran los resultados de los protocolos superovulatorios..	8
2.3.5 Métodos de predicción del éxito de un protocolo de superovulación.....	11
2.3.5.1 Mediciones hormonales.....	11
2.3.5.2 Tecnologías moleculares	13
2.3.6 Transferencia embrionaria.....	14
3 MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Ubicación y lugar de estudio	15
3.2 Instalaciones	15
3.3 Animales y Tratamientos.....	15
3.4 Datos climatológicos	16
3.5 Protocolo de superovulación	17
3.6 Recolección embrionaria.....	18
3.7 Llenado de la pajilla.....	20
3.8 Ecografía transrectal	20

3.9	Evaluación de la AMH	20
3.10	Respuesta Superovulatoria	21
3.11	Análisis estadístico.....	22
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1	Respuesta superovulatoria.....	24
4.2	Interacción de AMH respecto a la época del año.....	26
4.3	Respuesta superovulatoria en relación al nivel de AMH.	27
4.4	Correlaciones entre la respuesta superovulatoria y la concentración de AMH. 29	
4.5	Regresiones generales	30
4.6	Respuesta superovulatoria en época templada y cálida	30
4.7	Correlaciones entre la respuesta superovulatoria y la concentración de AMH, en base a la época del año.	31
4.8	Regresiones para la época templada.....	33
5	CONCLUSIONES	34
6	LITERATURA CITADA	35

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Valores promedio (\pm EE) para las variables de respuesta superovulatoria en vacas donadoras.	24
Cuadro 2. Significancias de los efectos fijos del modelo utilizado.	27
Cuadro 3. Respuesta superovulatoria en relación al nivel de AMH.....	28
Cuadro 4. Correlación entre la concentración plasmática de AMH con las variables de respuesta al tratamiento de superovulación en vacas donadoras.	29
Cuadro 5. Análisis de regresión general.....	30
Cuadro 6. Respuesta superovulatoria por época del año (Medias \pm EE)	31
Cuadro 7. Correlación de la concentración de AMH por época del año con las variables de respuesta a la superovulación en vacas donadoras.	32
Cuadro 8. Análisis de regresión correspondiente a la época templada.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de protocolo hormonal de superovulación.....	18
---	----

RESUMEN

La transferencia embrionaria en bovinos es una biotecnología orientada a incrementar el potencial reproductivo de vacas de alta genética; sin embargo, su principal desventaja es la variabilidad en la respuesta superovulatoria y en la recolección embrionaria de las vacas donantes sometidas a un mismo protocolo. Por ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de los niveles séricos de hormona Anti-mülleriana (AMH) sobre el número de folículos ováricos, cuerpos lúteos y embriones transferibles en vacas donadoras superovuladas durante un año en dos épocas (templada y cálida). Este experimento fue realizado en el establo comercial “El Llano”, ubicado en el Valle del Yaqui, municipio de Cajeme, Sonora. Un modelo de efectos mixtos fue utilizado para analizar la respuesta superovulatoria incluyendo nivel sérico de AMH y época del año como efectos fijos, la interacción nivel de AMH x época, la edad de la hembra en años, como covariable y el macho como efecto aleatorio. El nivel de AMH y época del año fueron significativas ($P < 0.05$) para algunas variables superovulatorias. Debido a esto, se procedió a realizar un análisis de correlación, encontrando valores de 0.45, 0.34 y 0.24 entre los niveles plasmáticos de AMH con número de folículos, de cuerpos lúteos y de embriones transferibles, respectivamente ($P < 0.05$). Los valores promedios para las variables de respuesta superovulatoria evaluadas fueron significativamente más elevados en vacas donadoras manejadas durante la época templada ($P < 0.05$). En conclusión, la hormona Anti-mülleriana (AMH) puede ser considerada un marcador endócrino

asociado a las variables de respuesta superovulatoria cuando las vacas son manejadas durante la época templada, debido a que se observó un efecto negativo sobre la respuesta superovulatoria en vacas manejadas durante el verano.

Palabras claves: Hormona Anti-mülleriana, superovulación, transferencia embrionaria, época.

ABSTRACT

Embryo transfer in cattle is a biotechnology focused on enhancing the reproductive potential of genetically superior cows; however, its main disadvantage is the variability in the superovulatory response and embryo collection from donor cows managed under the same hormonal protocol. Then, objective of this study was to evaluate the effect of serum level of Anti-mullerian hormone (AMH) on the number of ovarian follicles, corpus luteum and transferable embryos in superovulated cows managed in two different seasons (cool and warm). This experiment was developed in “El Llano” comercial dairy herd, which is located in the Yaqui Valley, Cajeme, Sonora. A mixed effects model was used to analyze the superovulatory response including the serum AMH levels and season as fixed effects, the AMH x season interaction, the age of the cow as covariable and the sire as random effect. Both AMH serum level and season resulted as significant ($P < 0.05$) sources of variation for some superovulatory variables. Therefore, a correlation analyses was developed between serum AMH levels and superovulatory variables such as number of follicles, number of CLs and number of transferable embryos, which showed values of 0.451, 0.340 and 0.249, respectively ($P < 0.05$). Average for superovulatory variables were higher ($P < 0.05$) in donor cows managed under the cool season. In conclusion, the AMH should be considered as endocrine marker associated to variables of supervovulatory response when the cows are managed under the cooling season, because this response was negatively influenced in cows managed during summer season.

Key words: Anti-müllerian hormone, superovulation, embryo transfer, season.

1 INTRODUCCIÓN

Actualmente en México, las dependencias federales, estatales, instituciones de educación superior e investigación y organizaciones de productores, están involucradas en el desarrollo de las actividades que reconocen la importancia de los recursos genéticos pecuarios, como un componente esencial para mejorar la eficiencia productiva (CONARGEN, 2012). Una de las biotecnologías reproductivas con mayor aportación al mejoramiento genético al hato, es la transferencia embrionaria, sin embargo uno de los principales problemas que ésta enfrenta es la variabilidad en la respuesta superovulatoria y en la recolección embrionaria entre un animal y otro, lo cual puede estar relacionado a factores externos como el medio ambiente o factores intrínsecos del animal mismo. Por ello se han buscado alternativas que permitan predecir la respuesta de vacas donadoras antes de iniciar un tratamiento superovulatorio, ya que el costo del mismo es elevado. En la actualidad, la hormona antimülleriana (AMH) es el mejor marcador endócrino de la reserva folicular ovárica y de la respuesta al tratamiento de estimulación ovárica en el ganado (De Vet *et al.*, 2002; Fauser *et al.*, 2008). Benyei *et al.* (2003) demostraron que la AMH tenía un alto grado de correlación con el recuento de folículos antrales de ovario, número de folículos y oocitos sanos. Monniaux *et al.* (2010) reportaron que, en la vaca, la AMH es un muy buen marcador endócrino de la población de pequeños folículos antrales que constituyen el objetivo directo de los tratamientos de estimulación ovárica. Por lo anterior, se pretende correlacionar esta respuesta con otros factores extrínsecos como la época del año. Lozano-Domínguez *et al.* (2010) indican que las temperaturas elevadas provocan estrés calórico en los animales, lo

cual afecta la viabilidad embrionaria y el medio ambiente materno para el establecimiento de la gestación. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de los niveles séricos de la hormona Anti-mülleriana (AMH) sobre el número de folículos ováricos, cuerpos lúteos y embriones transferibles en vacas donadoras superovuladas manejadas durante dos épocas del año (templada y cálida).

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 SITUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CARNE Y LECHE DE BOVINO

En México existe ganado vacuno lechero, cárnico y doble propósito (carne y leche), representado por más de 30 razas o cruzas de bovinos para la producción de carne y dos más, para la producción de leche. En base a las características de adaptación de los genotipos bovinos, estos se distribuyen de acuerdo al clima de cada región, el cual determina fundamentalmente el desarrollo y propósito del hato (Zavala, 2011).

En las últimas décadas el consumo mundial de leche y sus derivados ha ido incrementando en los países en desarrollo principalmente (SE, 2012). Se estima que la población mundial consume anualmente cerca de 500 millones de toneladas en equivalente leche y sus derivados. Del total de leche consumida, el 85% corresponde a leche de vaca, 11% de búfala, 2% de cabra y 2% de otras especies (SE, 2012).

En cuanto a la producción de carne de res, es la tercera más producida en el mundo después de la carne de porcino y pollo. Esta participa con el 22% de la producción total de carne, y en México su producción se desarrolla bajo diferentes niveles tecnológicos, sistemas de manejo y finalidades de explotación, comprendiendo principalmente la producción de novillos para abasto, la cría de becerros para la exportación y la producción de pie de cría (FINANCIERA RURAL, 2012). Los primeros centros ganaderos de importancia nacen en Chihuahua, Sonora y Durango. Paralelamente se desarrolla una ganadería intensiva en la comarca de La Laguna entre los estados de Coahuila y Durango, con apertura al mercado externo,

ya que los norteamericanos contribuyeron a orientarlo al mercado de exportación. La segunda gran región productora se sitúa en la costa del Golfo de México, donde condiciones más favorables permitieron una ganadería orientada, en parte, a la exportación. Más recientemente, nace el tercer gran centro productor en el centro del país, Jalisco donde el crecimiento de las ciudades ha provocado el desarrollo de una ganadería más intensiva (Angulo y Olivera, 2005).

2.1.1 Factores que afectan la producción

La producción de carne y leche de una vaca es el resultado de la relación del ambiente y la genética. Para que las evaluaciones genéticas sean precisas es importante que el registro de producción indique con el mayor cuidado posible el potencial genético de los animales (Cerón *et al.*, 2003). Asimismo, la fisiología, el comportamiento y la salud del ganado son marcadamente influenciados por el medioambiente en el cual el ganado vive, y que puede afectar significativamente el desempeño económico del mismo (Balling, 1980; MAFF, 2000). El desempeño productivo del ganado bovino de leche y carne está directamente afectado por los factores climáticos de su entorno productivo, particularmente la temperatura ambiental, la humedad relativa, la radiación solar y la velocidad del viento, los que en su conjunto pueden comprometer el balance térmico del ganado (Arias *et al.*, 2008).

2.2 CICLO ESTRAL DEL BOVINO

El ciclo estral se define como el intervalo que existe entre dos estros consecutivos y se caracteriza por cambios conductuales, hormonales y fisiológicos donde se incluyen procesos como foliculogénesis, ovulación y formación del cuerpo lúteo (CL) (Rangel-Portal *et al.*, 2010). Durante este proceso ocurren una serie de

eventos morfológicos, endócrinos y secretorios en ovarios y genitales tubulares, es decir, un grupo de folículos maduran durante la fase folicular, la hembra se vuelve receptiva a la monta durante el estro, el folículo dominante ovula y el CL se forma durante la fase lútea; el conocimiento de estas etapas del ciclo estral es útil para obtener una mejor detección y sincronización del estro, superovulación e inseminación artificial (Squires, 2006).

2.2.1 Etapas del ciclo estral

El ciclo reproductivo de la vaca consta de una serie de eventos que ocurren en un orden definido. La duración promedio del ciclo estral es de 21 días (rango: 17 a 24 días) y la finalidad es preparar el aparato reproductor para el estro y ovulación (Asprón, 2004). Los principales acontecimientos del ciclo estral se pueden dividir en tres fases: Fase folicular o de regresión lútea (proestro), fase periovulatoria (estro y metaestro), y fase luteal (diestro). El día cero del ciclo estral es considerado como el día que se presenta el celo o estro, signo visible a simple vista. Después le sigue el metaestro, etapa que dura de 3-4 días y en la cual se lleva a cabo la ovulación y formación del CL. Una vez formado el CL, al día del ciclo, inicia el diestro el cual culmina al día 18 con la destrucción del CL, iniciando así el próximo ciclo (Larocca *et al.*, 2005). La cronología señalada es aproximada y varía dependiendo de la duración del ciclo. Los eventos mencionados se basan en un ciclo completo en que no ocurrió la gestación. Si el óvulo es fertilizado y empieza la preñez, el CL no involuciona y continúa su función de secretar progesterona, además de que los folículos no se desarrollan hasta la madurez y no se manifiesta el celo. La progesterona evita

contracciones uterinas para tener condiciones favorables para el desarrollo del feto (Asprón, 2004).

2.2.2 Dinámica folicular

La dinámica folicular puede definirse como el proceso continuo de crecimiento y regresión de folículos antrales que conlleva al desarrollo del folículo preovulatorio (Lucy *et al.*, 1992). Borges *et al.* (2001) indican que en hembras bovinas, la dinámica folicular ocurre en forma de ondas, siendo descritas dos o tres ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral. Al inicio de este, una cohorte de folículos es reclutado del grupo de folículos antrales más pequeños (2 a 4 mm). El reclutamiento no es un fenómeno aislado o al azar, al parecer los folículos al ser reclutados como grupo o cohorte han recibido anteriormente una señal que les permite crecer y desarrollarse en vez de sufrir regresión. La señal que estimula el reclutamiento parece ser una ligera elevación de FSH en plasma (Fortune, 1994), aunque no se conocen claramente los factores involucrados en el desarrollo final de los folículos preovulatorios; pero la ovulación del primer folículo dominante puede inducirse mediante la administración de un análogo de GnRH (Crowe *et al.*, 1993). El final de la fase de selección se define, en la vaca, como el momento cuando un folículo (dominante) activo estrogénicamente, promueve su propio crecimiento e inhibe el crecimiento de otros folículos (Sunderland *et al.*, 1994). Si la regresión del cuerpo lúteo ocurre durante el crecimiento o la fase temprana de la dominancia, el folículo dominante, libre del medio hormonal restrictivo impuesto por la progesterona sobre el hipotálamo y la hipófisis, continuará su desarrollo hasta alcanzar la talla de un

folículo ovulatorio y eventualmente se disparará la cascada que conduce a la ovulación (Webb *et al.*, 1999).

2.3 BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS

2.3.1 Manipulación del ciclo estral

La sincronización del estro involucra el control o manipulación del ciclo estral con el propósito de que las hembras elegidas en un rebaño expresen estro (celo) aproximadamente al mismo tiempo. Es un manejo muy utilizado en los programas de inseminación artificial, trasplante de embriones, concentraciones de partos y uso intensivo, por pocos días, de un toro con monta natural. El factor determinante en el éxito de la sincronización es la elección del método adecuado, que se ajuste a las condiciones de cada animal. La sincronización consiste en la aplicación de uno o varios productos hormonales obtenidos en laboratorio. Según el producto a utilizar es la forma, momento y número de aplicaciones (Phillips, 2003).

2.3.2 Inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) es una de las prácticas de manejo más valiosas para la explotación del ganado, por medio de este procedimiento se incrementa considerablemente el progreso genético y se mejora la eficiencia de la reproducción. La IA puede proveer aparte del control de las enfermedades venéreas, otras ventajas como la conservación de semen por congelamiento, el cual escapa a las limitaciones de tiempo y distancia, puesto que puede estar en cualquier lugar y en cualquier momento (Gómez, 1995). La IA brinda a la industria bovina la oportunidad de utilizar material genético de alta calidad y un medio económico y de bajo costo

para aumentar la productividad de su empresa, dependiendo de las necesidades y objetivos de cada explotación (Medrano *et al*, 1996).

2.3.3 Superovulación

Existen una gran cantidad de protocolos de superovulación para bovinos, los cuales pueden variar en tiempo, cantidad de dosis y manejo que se le da a los animales. Al seguir con las indicaciones de los protocolos se debe tener la mayor disposición y responsabilidad, ya que un simple error en cualquier fase del proceso, afectaría la respuesta al tratamiento hormonal que se está suministrando (Orellana y Peralta, 2007). La superovulación es considerada como una técnica sumamente importante para obtener varios embriones de una excelente donadora. Sin embargo, una gran variabilidad en la respuesta individual al tratamiento de superovulación, ha sido un factor limitante que afecta la eficiencia en la producción embrionaria (Tonhati *et al.*,1999).

2.3.4 Factores que alteran los resultados de los protocolos superovulatorios

Los factores que afectan la respuesta superovulatoria se pueden clasificar en intrínsecos tales como estado nutricional, historia reproductiva, edad, raza, etc., y en extrínsecos entre los que se encuentran pureza y dosis de la hormona utilizada, vía y lugar de aplicación, frecuencia y época del año, etc. (Mapletoft *et al.*, 2000).

- **Estado nutricional:** La nutrición inadecuada afecta la función reproductiva en la mayoría de los mamíferos. Murphy *et al.* (1991) demostraron que el consumo de una dieta baja en energía reduce el diámetro del folículo dominante y acorta su persistencia en el ovario. La condición óptima para las

donadoras es una condición corporal entre 3.0 y 4.0 sobre un valor máximo de 5.0, determinando unas condiciones nutricionales adecuadas, como el nivel de energía en la ración, el que influye en las tasas de ovulación, fecundación y viabilidad de embriones (Vizuete, 2012).

- **Historia reproductiva:** Representa un factor sumamente importante que los animales cuenten con antecedentes reproductivos favorables, ya que se ha observado claramente que las donantes que ingresan a los programas de transferencia embrionaria con antecedentes de infertilidad tienen una menor producción que aquellas consideradas sanas (Cutini *et al.*, 2000).
- **Edad:** En un estudio realizado por Hasler *et al.* (1983) se reportó que la edad de la donadora resultó un factor sumamente importante en la respuesta superovulatoria ya que se observó una mejor respuesta en vacas menores de diez años, en contraste con las mayores a esta edad. En otro estudio no se encontró efecto de la edad sobre el número total de embriones recuperados hasta los nueve años de edad, luego de los cuales se observó una reducción en el número de folículos (Donaldson, 1984). Recientemente, Malhi *et al.* (2005) reportaron que las células de los ovocitos y la cantidad de embriones transferibles es menor en vacas viejas que en vacas jóvenes.
- **Raza:** Se sabe que existen diferencias en la fisiología reproductiva de bovinos de las razas *Bos taurus* y *Bos indicus*. Se ha reportado que las razas *Bos indicus* tienen un mayor número de folículos por cada onda folicular (Carvalho *et al.*, 2008). En un estudio retrospectivo hecho en donantes de razas lecheras

y productoras de carne, se observó en la raza Jersey una mayor proporción de donantes con respuesta ovárica excesiva, sin aumentar el número de embriones transferibles/ recolección (Holm *et al.*, 1987).

- **Hormonas utilizadas:** Existe una extensa variabilidad de productos utilizados para inducir ovulación múltiple en bovinos, en los cuales las preparaciones hormonales influyen directamente en la respuesta superovulatoria de cada donadora de embriones (Kanitz *et al.*, 2002). La inducción a la superovulación se efectúa principalmente con gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMSG) o con extractos de pituitaria porcina que generalmente se conocen como FSH-p, a pesar de que en muchos casos contienen mayor cantidad de hormona luteinizante (LH) que de hormona folículo estimulante (FSH-p) (Duica *et al.*, 2007). Se ha reportado que cuando se utilizan extractos de pituitaria purificados, con baja contaminación de LH, mejora la respuesta superovulatoria en el ganado bovino (Mapletoft *et al.*, 2002).
- **Epoca:** Los estudios realizados teniendo en cuenta el efecto de la época del año sobre la respuesta a la superovulación, han arrojado resultados contradictorios (Hasler *et al.*, 1983; Church, 1993). En un trabajo más reciente, donde se analizaron datos de manera retrospectiva para comparar la influencia de la estación sobre la producción de embriones, se encontró que las estaciones de invierno y primavera fueron las más favorables para producir un mayor número de embriones transferibles (Ochoa *et al.*, 2009). Además, durante los meses de verano, se produce un estrés térmico en las vacas

Holstein afectando su respuesta superovulatoria y la calidad de los embriones (Sartori *et al.*, 2002).

2.3.5 Métodos de predicción del éxito de un protocolo de superovulación

2.3.5.1 Mediciones hormonales

- **Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1):** Es de naturaleza peptídica y es producido en las células de la teca del ovario. Este factor participa en el crecimiento, desarrollo y maduración folicular, además de tener un papel importante en la foliculogénesis inducida por las gonadotrofinas, en la esteroidogénesis ovárica y en la función del CL, así como en la actividad de la pituitaria y del hipotálamo (Lenz *et al.*, 2007). Ruiz-Arboleda *et al.* (2011) concluyen que el IGF-1 no es un predictor de eventos reproductivos, sino más bien un estimador indirecto de la aptitud del animal para lograr la reproducción. Esto es, en parte, porque el IGF-1 endócrino no proporciona ninguna información acerca de acciones autócrinas o parácrinas. Para hacer más complejo el mecanismo, el IGF-1 necesita interactuar con otras hormonas (por ejemplo las gonadotropinas) para lograr la plena reproducción. La principal aplicación es la posible utilidad de la concentración de IGF-1 como un factor de predicción de la fertilidad futura de terneras. Sin embargo, después de casi dos décadas de investigación, no hay ninguna evidencia sobre que el IGF-1 se pueda utilizar como un indicador preciso de la capacidad reproductiva en bovinos (Ruiz-Arboleda *et al.*, 2011).

- **Hormona Anti-mülleriana (AMH):** Kawamata (1994) define la hormona Anti-mülleriana (AMH) como una glicoproteína que pertenece a los factores de transformación beta y la familia del factor de crecimiento, la cual es producida por células de la granulosa de folículos en crecimiento sanos. En humanos, esta hormona fue estudiada principalmente por su papel regulador en la diferenciación sexual masculina. La AMH producida por las células de Sertoli del testículo fetal induce la regresión de los conductos de Müller (Josso *et al.*, 1993; Lee y Donahoe, 1993). Sin embargo, después del nacimiento, este patrón de expresión del sexo dimórfico se pierde y la AMH se expresa también en células de la granulosa de folículos en crecimiento en el ovario. La AMH en hembras es producida por las células granulosas de los folículos preantrales (primarios y secundarios) y antrales pequeños. Esta hormona actúa inhibiendo el reclutamiento de los folículos primarios, así como también en la fase de crecimiento folicular dependiente de FSH. Al expresarse exclusivamente en las células granulosas de los folículos no seleccionados, se convierte en un candidato ideal para representar tanto la cantidad como la calidad del conjunto de folículos ováricos. En la actualidad, la AMH es el mejor marcador endócrino de la reserva folicular ovárica y de respuesta al tratamiento de estimulación ovárica en humanos (Gruijters *et al.*, 2003; Durocher *et al.*, 2006; Visser *et al.*, 2006; Ireland *et al.*, 2007), y observaciones similares han sido reportadas en el ratón (Kevenaar *et al.*, 2006) y en el ganado (De Vet A, *et al.*, 2002; Fauser *et al.*, 2008). Recientemente se ha demostrado que las concentraciones de AMH pueden predecir la población folicular y el número de

ovocitos en vacas y vaquillas (Ireland *et al.*, 2007), y que las concentraciones de AMH en suero antes de la superovulación están altamente correlacionadas con el número de ovulaciones después del tratamiento (Rico *et al.*, 2009). A pesar de la importancia de la AMH como un marcador endócrino de las poblaciones de folículos en crecimiento en todas las especies estudiadas, se sabe poco sobre la regulación de su expresión y la producción. La expresión de AMH se ha demostrado que es más alta en las células de la granulosa de folículos antrales, preantrales y pequeños, y disminuye durante el crecimiento folicular en la fase terminal y atresia, por ejemplo en la rata (Baarends *et al.*, 1995) y la vaca (Rico *et al.*, 2009). Las bajas concentraciones de AMH se han encontrado en el líquido folicular de grandes folículos antrales y preovulatorios estrogénicos en humanos (Seifer *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 2010) y en la vaca (Monniaux *et al.*, 2008; Rico *et al.*, 2009).

2.3.5.2 **Tecnologías moleculares**

Collier *et al.* (2006) establecieron que las nuevas estimaciones entre las interacciones genéticas y medioambientales, soportan el uso de herramientas biotecnológicas recientes disponibles para identificar la base genética del estrés calórico y su tolerancia, lo que ocasiona una identificación directa de variaciones útiles en genes y en secuencias de ADN que proporciona nuevas oportunidades para la manipulación genética de características de relevancia agropecuaria y de impacto en el mercado consumidor. Integrando diferentes metodologías, y con la participación de la biología molecular, genética, y biología computacional, el foco central de la genómica pasó a ser el estudio de la estructura, función y evolución de genomas

completos y genes específicos, utilizando tecnologías de secuenciación de ADN, mapeo genético y físico, y expresión genética diferencial (Grattapaglia y Ferreira, 2006). Estudios recientes realizados por Hirayama (2012) revelaron que una combinación de marcadores fisiológicos y genéticos tiene un efecto sinérgico sobre la confiabilidad de las predicciones de respuesta superovulatoria. Estos marcadores podrían ser explotados en la pre-selección de las vacas donantes utilizadas para superovulación y la mejora genética de los hatos.

2.3.6 Transferencia embrionaria

La transferencia de embriones se refiere al proceso de "transferir" un embrión, recogido ya sea de una donante o desarrollado *in vitro*, para introducirlo en el tracto reproductivo de un animal receptor. Independientemente de la especie, esta técnica ha sido ampliamente estudiada; en general, es una herramienta valiosa en la biotecnología animal con muchas aplicaciones (Dziuk, 1975). La transferencia embrionaria se ha visto como una alternativa para incrementar la tasa de gestación de las vacas lecheras en épocas cálidas. Varios estudios realizados en vacas receptoras de embriones frescos producidos *in vitro* (Ambrose *et al.*, 1999; Al-Katanani *et al.*, 2002) o de embriones recolectados de vacas superovuladas (Putney *et al.*, 1989; Drost *et al.* 1999; Vasconcelos *et al.* 2006) han reportado una mejora de la tasa de gestación en condiciones de estrés calórico, comparada con la observada en vacas servidas con inseminación artificial.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación y lugar de estudio

El presente estudio fue realizado en el establo comercial “El Llano”, ubicado en el Block 811 con coordenadas geográficas 27° 19' 7.61" LN y 109° 52' 1.15" LO, en el Valle del Yaqui, municipio de Cajeme, Sonora. Las condiciones climáticas en esta región se caracterizan por lluvias en verano (julio-septiembre), con una precipitación promedio anual de 520.1 mm y temperaturas promedio anuales de 33.6°C como máxima y 17°C como mínima (Sánchez, 2013).

3.2 Instalaciones

Los animales incluidos en el estudio estuvieron alojados en 4 corrales, cada uno con una superficie total de 2500 m², con sombras a una altura de 5.5 m y orientadas de norte a sur. La sombra abarcaba parte del comedero (3.2 m² por animal) y estaba construida en dos aguas. Adicionalmente, cada corral tenía 2 bebederos sombreados de 0.6 m³. La distribución de los corrales es en batería con comedero central y un pasillo lateral de 3.5 m².

3.3 Animales y Tratamientos

Se utilizaron 66 vacas multíparas *Bos Taurus* como hembras donadoras, 46 de razas productoras de carne de raza pura (Gelvieh, Simmental, Charoláis francés y Angus) y 20 de razas productoras de leche (Holstein y Pardo suizo americano), no lactantes, con condición corporal de 6 (escala del 1 al 9, donde 1=emaciada y 9=obesa; Herd y Sprott, 1986) y una edad promedio de 7 años. Todos los animales se encontraban sanos y contaban con un buen historial reproductivo. Las vacas donadoras permanecieron alojadas en corrales de manejo intensivo, con acceso libre

a agua y sombra, recibiendo una dieta integral, compuesta de 60% forraje y 40% concentrado comercial. Se buscó que el contenido nutricional de la dieta durante el estudio fuera de 16.1% de proteína cruda, 5.6% de extracto etéreo, 30.6% FDN y una ENL de 1.67 mcal/kg, con un consumo ajustado a 24 kg de materia seca. La dieta fue ofrecida dos veces por día y minerales a libre acceso. Todos los animales fueron sometidos al mismo protocolo de superovulación y recolección de embriones, evaluando su respuesta superovulatoria y concentración de AMH, considerando en forma separada la época del año. Para la época del año se consideraron dos niveles, época templada y época cálida).

3.4 Datos climatológicos

Los datos de temperatura (T) y humedad relativa (HR) se recolectaron de una estación meteorológica (INIFAP, Valle del Yaqui bloque 910) ubicada aproximadamente a 800 m del lugar de estudio. El ITH se calculó usando la fórmula propuesta por Hahn (1999): $ITH = 0.81 \times T + HR (T - 14.40) + 46.40$. El experimento fue realizado de enero a diciembre del año 2012. Se agruparon los resultados en dos épocas: templada (primavera e invierno) y cálida (verano y otoño). En la época templada la temperatura promedio fue de 20°C, con una mínima de 13°C y máxima de 26°C, para la época cálida los intervalos registrados fueron de 15°C como mínima y una máxima de 31°C, con un promedio de 23°C. Respecto a los valores de ITH; en la época templada fueron de 57.5 mínimo y un máximo de 78 con un promedio de 66.7. Para la época el promedio fue de 69 con un mínimo de 59 y un máximo de 82.

3.5 Protocolo de superovulación

Antes de iniciar el programa, las vacas donadoras se seleccionaron en base a los registros productivos y reproductivos, considerando estado fisiológico del animal, condición corporal e historial reproductivo, los cuales mostraron lo más sobresaliente de las vacas donadoras en relación al resto de los animales. Se consideró tomar en cuenta la superioridad fenotípica, además de evaluar su aparato reproductor a través de ultrasonografía transrectal para confirmar su actividad ovárica.

Todas las vacas se encontraban en una fase aleatoria del ciclo estral y recibieron al día 0 un dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR Pfizer® 1.4 mg de progesterona natural) y benzoato de estradiol (2,76 mg) más progesterona (50 mg) para sincronizar el estro. El tratamiento de superovulación se inició el día 4 con dosis decrecientes (120, 80, 40 y 20, mg) de la hormona estimulante del folículo (Folltropin-V) inyectada dos veces al día (07:00 y 19:00 h.) durante 4 días. La inseminación artificial (IA) se realizó los días 8 (20:00 h.) y 9 (08:00 h.), mientras que la recolección de embriones inició el día 15.

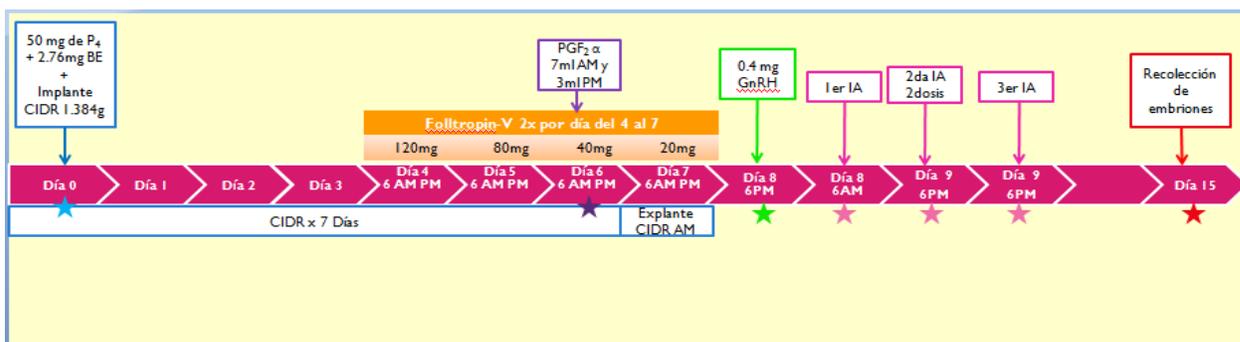


Figura 1. Esquema de protocolo hormonal de superovulación.

3.6 Recolección embrionaria

Los embriones fueron recolectados a través de la técnica no-quirúrgica, misma que consistió en la recuperación embrionaria por vía cérvico-vaginal. Previo a ello, la vaca donadora se sometió a una revisión ultrasonografía para verificar la actividad ovárica al momento de la recolección. Se sujetó la cola del animal de manera que no estorbara durante el proceso y se administró anestesia epidural (lidocaína 2%). Una vez que la anestesia hizo efecto, se lavó y limpió el área genital y se introdujo el catéter de Foley en el vestíbulo de la vulva, al llegar al último anillo se mantuvo el cuerno uterino ligeramente elevado, frente a la punta del catéter. Esto se efectuó con especial precaución para controlar la fuerza ejercida sobre el catéter, a fin de no atravesar bruscamente el cérvix y perforar la pared uterina, ya que cuando el instrumento alcanza el cuerno del útero, éste último se endereza levantándolo de su cara ventral mientras se avanza el catéter muy suavemente hasta un 1/3 medio del órgano (Palma, 2001). Una vez que se llegó a este punto, se infló el balón (~15-25 mm³ de aire) para sellar la unión del cérvix con el cuerpo del útero y evitar que se zafara la sonda. Después de que se colocó la sonda, el medio de lavado (Complete Flush Solution ViGRO®) se puso a una temperatura de 37°C y se instaló el filtro para los embriones; se procedió a introducir el líquido, realizando en forma simultánea un masaje en el útero de la vaca para poder coleccionar los embriones a través de la sonda y hacerlos llegar hasta el filtro, el cual estaba protegido del sol (González, 2001).

El filtro con los embriones fue llevado al laboratorio para la búsqueda y clasificación de embriones, dejando una cantidad suficiente de medio en el filtro para que facilitara la búsqueda, aislamiento y manipulación de los embriones. A este se le realizaron dos lavados, inclinándolo a 45°. Al vaciar todo el medio, se procedió a buscar los embriones. El plato contenía cuadros divididos del 1 al 5 en forma vertical y de la A hasta E en forma horizontal para facilitar la búsqueda. Se realizaron de 2 a 3 búsquedas en el plato para encontrar el número máximo de embriones.

Una vez encontrado un embrión, éste se extrajo cuidadosamente y se depositó en el plato de lavado (con seis compartimentos). Al recolectar todos los embriones, éstos fueron transferidos a un plato de mantenimiento el cual contenía medio holding y se realizó una limpieza para eliminar cualquier suciedad adquirida en el proceso. Todos los medios se mantuvieron en la plancha térmica (termostato) a 37°C para evitar que se dañara el embrión. Una vez colocados todos los embriones en el medio de mantenimiento, se realizó la evaluación en base al sistema de clasificación establecido por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), en el cual se toma en cuenta su estadio y calidad. Dicho sistema se describe a continuación:

1. Estadio Embrionario: Mórula, mórula compacta, blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido.
2. Calidad Embrionaria: Excelente (calidad 1) que corresponde a un embrión con masa simétrica y esférica con blastómeros individuales que son uniformes en tamaño, color y densidad. Regular (calidad 2) que es un embrión con moderadas

irregularidades en forma, tamaño, color o densidad de la masa embrionaria. Pobre (calidad 3) cuando las irregularidades son mayores y afectan al 75% de la masa embrionaria. Muerto o degenerado (calidad 4).

Al finalizar la evaluación, solamente los embriones de calidad 1 fueron considerados como viables, independientemente del estadio embrionario.

3.7 Llenado de la pajilla

Es un proceso muy sencillo cuando se va a realizar una transferencia en fresco, en este caso se introdujo dentro de la pajilla el embrión con medio de mantenimiento Holding plus ViGRO®, etiquetando individualmente cada pajilla.

3.8 Ecografía transrectal

Se tomó el registro de actividad ovárica realizando tres monitoreos utilizando el ultrasonido Micromax de Sonosite®, con transductor transrectal de 7.5.0 MHz. Estas revisiones se realizaron los días 0, 8 y 15, correspondiendo el día 0 como el día de inicio del protocolo, fecha en la cual se registró la presencia de actividad ovárica al encontrar folículos y/o cuerpos lúteos. La ultrasonografía transrectal se realizó de nuevo los días 8 y 15 para estudiar la dinámica ovárica, la cual se determinó en base a la cantidad y tamaño de folículos presentes el día 8, y por la cantidad y tamaño de CLs presentes el día 15.

3.9 Evaluación de la AMH

Para los análisis hormonales, se extrajeron muestras de suero sanguíneo de cada una de las vacas para determinar los niveles de la hormona Anti-mulleriana (AMH). Las muestras fueron recolectadas al día 0 del tratamiento superovulatorio,

correspondiente al inicio del programa, para lo cual se extrajeron 8 ml de sangre a partir de la vena coccígea (base de la cola), con un kit de muestreo sanguíneo: usando aguja para toma y recolección de sangre (0.8x38 mm) y tubos de 10 ml sin anticoagulante BD vacutainer®, los cuales se identificaron y colocaron en una hielera a 5°C para ser transportados al laboratorio, donde fueron centrifugados en una centrifuga Beckman coulter® modelo allegra™ X-22 (2500 RPM / 30 min) para la extracción de suero. Todo esto fue realizado según la metodología descrita por Souza *et al.* (2007), y se evaluaron los niveles de la hormona con el kit Anti-müllerian Hormone (AMH) ELISA Sample Test Kit for Bovine Blood Serum (Minitube Of America, Inc.^(R)), el cual tiene una sensibilidad de 117 pg/ml. El procedimiento fue realizado de acuerdo con las normas establecidas por el fabricante. El nivel de concentración de AMH en suero en los animales registro 126 hasta 1400 pg/ml. En base a los niveles de AMH los animales se clasificaron en dos categorías: alto para las vacas que presentaban una concentración >400 pg/ml y normal para aquellas que tenían de 100-400 pg/ml.

3.10 Respuesta Superovulatoria

Las variables analizadas correspondientes a la respuesta superovulatoria fueron las siguientes: tamaño y número de folículos presentes el día 8 (día de la IA), y tamaño y número de cuerpos lúteos presentes el día 15 (día de la recolección de embriones). La tasa ovulatoria fue calculada como la proporción entre la cantidad de cuerpos lúteos con respecto a la cantidad de folículos por vaca; la tasa de recolección se determinó como la proporción entre los embriones recolectados por vaca y la cantidad de cuerpos lúteos presentes; y la tasa de viabilidad se estimó

como la proporción entre los embriones recolectados de calidad 1 con respecto al total de embriones recolectados por vaca. Todas las variables fueron consideradas con distribución continua ya que las tasas de ovulación, de recolección y de viabilidad, fueron transformadas a base porcentual para cada vaca.

3.11 Análisis estadístico

Un modelo de efectos mixtos fue utilizado a través del procedimiento PROC MIXED para analizar la respuesta superovulatoria incluyendo el nivel sérico de AMH y la época como efectos fijos, la interacción nivel de AMH x época, la edad en años como covariable y el macho como efecto aleatorio. En este modelo se incluyó inicialmente el efecto del grupo racial (donde 1=bovinos productores de carne y 2=bovinos productores de leche); sin embargo, este efecto no resultó significativo ($P > 0.05$) para ninguna variable superovulatoria por lo que no fue considerado para análisis posteriores. Tanto el nivel de AMH, como la época del año, resultaron ser fuentes significativas de variación ($P < 0.05$) para número de folículos, número de cuerpos lúteos y embriones recolectados.

Debido a que el efecto fijo del nivel de AMH (alto y normal) resultó significativo, se procedió a realizar un análisis de correlación entre las concentraciones séricas de la AMH y las variables de respuesta superovulatoria, a través del procedimiento PROC CORR. Dicho análisis se realizó para determinar el grado de asociación entre las variables antes mencionadas de acuerdo a la época del año; tanto en la época cálida, como en la época templada.

Se realizó un análisis de regresión lineal simple usando el procedimiento PROC REG se desarrolló entre las concentraciones séricas de AMH aquellas variables de respuesta superovulatoria con mayor índice de correlación (número de folículos, cuerpos lúteos y embriones recolectados), con la finalidad de determinar la significancia y de la concentración de AMH como predictor de la respuesta superovulatoria en vacas donadoras manejadas en diferente época del año. Todos los procedimientos antes descritos fueron desarrollados utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.4 (SAS Inst. Inc. Cary. NC).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Respuesta superovulatoria

El Cuadro 1 muestra los promedios y errores estándar para las variables de respuesta superovulatoria en las vacas donadoras.

Cuadro 1. Valores promedio (\pm EE) para las variables de respuesta superovulatoria en vacas donadoras.			
VARIABLES	N	MEDIAS	EE
Número de folículos	66	15.53	1.074
Tamaño de folículos, mm	66	11.34	0.097
Número de cuerpos lúteos	66	10.03	0.760
Tasa ovulatoria, %	66	64.55	3.214
Embriones recolectados	58	6.63	0.625
Tasa de recolección, %	59	61.22	4.209
Tasa de viabilidad, %	60	76.53	3.794
AMH, pg/ml	66	902.04	82.76

Como es sabido, el principal objetivo de un programa de superovulación es producir el mayor número de embriones transferibles como sea posible, sin embargo, esta respuesta está sujeta a una gran cantidad de factores intrínsecos y extrínsecos, lo cual hace que sea muy variable dificultando el establecer un estándar para la respuesta superovulatoria en los animales. Estas medias pueden ser comparadas con las proporcionadas por el censo anual de la AETA, en el que los promedios fueron 7.0 embriones para ganado bovino productor de carne (>24, 000 donantes) y

6.3 embriones para ganado lechero (>15,000 donantes) en 2011, siendo éste el último año del que se dispone de los resultados (Hasler, 2013). Al comparar las medias obtenidas con otros estudios en los cuales se utilizaron protocolos de superovulación similares, se observan diferencias positivas y negativas; al respecto, Tribulo *et al.* (2011), en un comparativo de protocolos hormonales realizado en vacas donantes Angus Rojo obtuvieron con el protocolo tradicional un promedio de 13.8 cuerpos lúteos y 8.4 embriones recolectados. En otro estudio realizado por Aké *et al.* (1995), las variables promedio en ganado *Bos indicus* fueron de 15.1 cuerpos lúteos, 11.6 embriones recolectados y una tasa de recolección de 85.40%. En comparación con este experimento se observa que los resultados son más elevados, sin embargo, no difieren demasiado de los obtenidos en el presente estudio. En una investigación realizada en vacas Holstein y Brahman, en la cual no se mostró diferencia significativa entre razas, la tasa de recolección fue muy similar a la nuestra (66.0 y 69.0; Krininger III *et al.*, 2003). Se observó gran variabilidad en los estudios documentados, ya que existen muchos factores involucrados que influyen en la respuestas al tratamiento superovulatorio, tal como lo describen Bó *et al.* (2002) quienes establecen que la variabilidad en la respuesta sigue siendo uno de los principales problemas asociados con los programas de sincronización de celo y superovulación en ganado bovino. Colazo y Mapletoft (2007) indicaron que a pesar de toda la investigación llevada a cabo en los últimos años, no ha habido un mejoramiento en la cantidad promedio de embriones producidos por tratamiento superestimulador. Lo que si se ha mejorado notablemente es la producción de embriones producidos por donantes por año.

4.2 Interacción de AMH respecto a la época del año.

El Cuadro 2 muestra los resultados del análisis de varianza para la respuesta superovulatoria, observando que la interacción sólo resultó significativa para el tamaño de folículos y tasa ovulatoria. Lo cual indica que el resto de las variables se encuentra mayormente asociadas a otro tipo de factores externos, sin embargo se observa que existe una relación significativa ($P < 0.05$) entre número de folículos, cuerpos lúteos y tasa ovulatoria con la concentración de AMH, mientras que época afectó ($P < 0.05$) a número de embriones recolectados, tasas de recolección y viabilidad, mientras que este mismo efecto solo tendió ($P < 0.10$) afectar a número de folículos y tamaño de cuerpos lúteos.

Estos resultados se asocian con las respuestas intrínsecas de los animales a los estímulos externos del medio ambiente y coinciden con lo encontrado por Monniaux *et al.* (2010), quienes proponen que la concentración de AMH en el plasma de vacas donantes puede ser utilizada como método predictivo sencillo para evaluar su nivel de actividad ovárica y su capacidad para producir embriones. Sin embargo, las condiciones óptimas para la aplicación de esta prueba de diagnóstico en el ganado aún no se han definido teniendo en cuenta otros factores como edad, raza, estado fisiológico y factores ambientales relacionados con las condiciones de superovulación correspondientes a cada animal.

Cuadro 2. Significancias de los efectos fijos del modelo utilizado.			
	AMH	ÉPOCA	AMH*ÉPOCA
VARIABLE	Valor de P		
Número de folículos	0.0023	0.0846	0.3664
Tamaño de los folículos, mm	0.5075	<.0001	0.0002
Número de cuerpos lúteos	0.0001	0.0788	0.8457
Tasa ovulatoria, %	0.0023	0.0592	0.0028
Número de embriones recolectados	0.0323	0.0398	0.5469
Tasa de recolección, %	0.4465	0.0189	0.8528
Tasa de viabilidad, %	0.3512	<.0001	0.1126

4.3 Respuesta superovulatoria en relación al nivel de AMH.

En el Cuadro 3 se compara la respuesta superovulatoria promedio correspondiente a niveles altos y normales de AMH en plasma, obteniéndose una diferencia significativa ($P < 0.05$) en todas las variables analizadas. Se observó que los valores promedio de número de folículos, de cuerpos lúteos y de embriones recolectados fueron mejores en aquellas donadoras que presentaban niveles altos de AMH.

Cuadro 3. Respuesta superovulatoria en relación al nivel de AMH		
AMH		
	ALTO (400 pg/ml)	NORMAL (100-400 pg/ml)
VARIABLES		
Número de folículos	19.08 ± 0.98 ^a	10.91 ± 1.67 ^b
Número de Cuerpos lúteos	12.80 ± 0.61 ^a	6.50 ± 1.04 ^b
Embriones recolectados	7.28 ± 0.53 ^a	3.87 ± 1.11 ^b

^{a, b} Medias con diferente literal dentro de hilera, indican diferencia (P<0.05).
(AMH) hormona antimülleriana

Lo anterior es un indicativo de que animales con niveles de AMH elevados tienen una mejor respuesta al tratamiento superovulatorio que los animales con niveles normales. Sustentando lo anterior, varios estudios afirman que altos niveles de esta hormona se verán reflejados en una mejor respuesta folicular en el animal. Un análisis realizado en ganado bovino por Ireland *et al.* (2007), muestra que las concentraciones de AMH fueron aproximadamente 6 y 2 veces mayores en animales con un recuento de folículos antrales altos o intermedios, respectivamente, en comparación con los de baja concentración. En otro estudio realizado por Guerreiro *et al.* (2014), las donadoras clasificadas con niveles altos de AMH produjeron un mayor número de embriones (Holstein: 3.0; Nelore: 7.0) en comparación con aquellas de bajos niveles de AMH (Holstein: 1.2; Nelore: 2.2), siendo esta diferencia significativa.

4.4 Correlaciones entre la respuesta superovulatoria y concentración de AMH.

En las variables mostradas en el Cuadro 4 destaca la alta correlación entre la concentración de AMH y la cantidad de folículos producidos por las vacas donantes, lo cual indica que entre más elevados sean los niveles séricos de AMH, mayor será la respuesta folicular obtenida en la vaca donante. Se observa además una correlación significativa de la concentración de AMH con el tamaño de los folículos, cuerpos lúteos y número de embriones recolectados.

Cuadro 4. Correlación entre la concentración plasmática de AMH con las variables de respuesta al tratamiento de superovulación en vacas donadoras.		
VARIABLE	AMH	
	R	Valor de P
Número de folículos	0.451	<.0001
Número cuerpos lúteos	0.340	0.0007
Número de embriones recolectados	0.249	0.020

Los resultados observados resultan lógicos, ya que las variables antes mencionadas se encuentran directamente relacionadas con la respuesta folicular presente en el animal. Estos resultados coinciden con los datos obtenidos por Hirayama *et al.* (2012), donde la concentración plasmática de AMH se correlacionó de manera significativa con el número de folículos, de óvulos / embriones, de embriones fertilizados y embriones transferibles. Datos similares se han encontrado también en otras especies; en un experimento realizado en ratones se observó que la disminución en la concentración plasmática de AMH se correlaciona directamente con la disminución del número de folículos en crecimiento ($r = 0.86$), y se encontró

que el número de folículos en crecimiento se correlacionó con el número de folículos primordiales ($r = 0.93$). Del mismo modo, se encontró una fuerte correlación entre los niveles de AMH y el número de folículos primordiales ($r = 0.83$). Por lo tanto, se propone a la AMH como un excelente marcador para evaluar el aspecto cuantitativo de la reserva ovárica (Kevenaar *et al.*, 2006).

4.5 Regresiones generales

En el análisis de regresión que se observa en el Cuadro 5, el nivel de AMH resultó ser un predictor del número de folículos, cuerpos lúteos y embriones recolectados en respuesta a la superovulación.

Se estima en los resultados que los valores predictivos por cada 1,000 pg de AMH en sangre muestran un incremento en el número de folículos, cuerpos lúteos y embriones recolectados de 5.08, 2.52, y 1.42, respectivamente.

Cuadro 5. Análisis de regresión general				
VARIABLES	B ₀	B ₁	r ²	P
Número de folículos	12.23782	0.00508	0.2041	<0.0001
Número de cuerpos lúteos	8.72933	0.00252	0.1159	0.0007
Número de embriones recolectados	5.28471	0.00142	0.0622	0.0205

4.6 Respuesta superovulatoria en época templada y cálida

El Cuadro 6 muestra los promedios y errores estándar de variables de la respuesta superovulatoria por época del año. En la época templada se observan los valores más altos para número de folículos, cuerpos lúteos, tasa ovulatoria, embriones recolectados y tasa de viabilidad. En contraste, las variables mencionadas

anteriormente, mostraron un comportamiento desfavorable en la época cálida. Estos resultados se asocian a la variación de temperatura a la que estuvieron expuestas las vacas donadoras en ambas épocas. Resultados similares se observan en un estudio realizado por Alves *et al.* (2007), quienes evaluaron el comportamiento superovulatorio para demostrar el efecto de la época en donadoras Holandesas, estudio en el cual obtuvieron los promedios del total de estructuras, viables, degeneradas y estructuras no fertilizadas, las cuales fueron 20.29 vs. 8.57; 14.57 vs. 7.14; 4.00 vs. 0.86 y 1.71 vs. 0.57 en invierno y verano, respectivamente.

Cuadro 6. Respuesta superovulatoria por época del año (Medias \pm EE)		
	Época	
	Templada (N=36)	Cálida (N=30)
Número de folículos	19.03 \pm 1.42 ^a	13.33 \pm 1.58 ^b
Tamaño de folículos, mm	11.70 \pm 0.11 ^a	10.85 \pm 0.13 ^a
Número cuerpos lúteos	12.64 \pm 0.99 ^a	8.40 \pm 1.11 ^b

^{a, b, c} Medias con diferente literal dentro de hilera, indican diferencia (P<0.05).

4.7 Correlaciones entre la respuesta superovulatoria y la concentración de AMH, en base a la época del año.

Se observa en el Cuadro 7 una elevada correlación entre el número de folículos, cuerpos lúteos y embriones transferibles con los niveles de AMH en plasma para las vacas donadoras trabajadas durante la época templada, pero estas correlaciones demostraron ser bajas en la época cálida.

Cuadro 7. Correlación de la concentración de AMH por época del año con las variables de respuesta a la superovulación en vacas donadoras.				
N	Época del año			
	Templada		Cálida	
	36		30	
Variable	R	P	r	P
Número de folículos	0.657	<.0001	0.256	0.318
Tamaño de los folículos, mm	-0.039	0.805	-0.183	0.237
Número cuerpos lúteos	0.523	0.0004	0.275	0.371
Tasa ovulatoria, %	-0.435	0.004	0.359	0.146
Embriones Recolectados	0.431	0.004	-0.168	0.390
Tasa de recolección, %	-0.028	0.856	0.050	0.117
Tasa de viabilidad, %	-0.020	0.898	0.060	0.848

Estos resultados indican que los cambios en los niveles AMH en plasma están relacionados con las variaciones ambientales, por lo que pudiera proponerse a la AMH como un marcador endócrino en la época templada. Desafortunadamente se carece de estudios previos que evalúen el comportamiento de la hormona respecto a la época del año, sin embargo, estos datos se pueden asociar al comportamiento del metabolismo animal bajo condiciones estables, como debe suceder cuando son manejados en condiciones templadas en las cuales el animal se encuentra en una zona de confort o zona termoneutral, que son los límites de temperatura ambiental

dentro de los cuales el calor normal generado para mantenimiento y de los procesos productivos están en situación no estresante, por lo que no hay problema en la pérdida de calor y el animal manifiesta al máximo su potencial productivo genéticamente establecido (Alzina-López *et al.*, 2001).

4.8 Regresiones para la época templada

En el Cuadro 8 se observan los modelos de regresión entre las concentraciones de AMH y la respuesta superovulatoria para los animales que fueron trabajados en la época de templada. El nivel de AMH resultó ser un predictor para el número de folículos, cuerpos lúteos y embriones recolectados, ya que el modelo indica un incremento de 9.56 folículos, 4.03 cuerpos lúteos y 2.08 embriones recolectados por cada 1,000 pg de AMH en sangre.

Lo anterior indica un efecto predictor de la AMH principalmente sobre el número de folículos, lo cual coincide con lo reportado por Ireland *et al.* (2007), quienes postulan a la AMH como un predictor de la reserva folicular ovárica.

Cuadro 8. Análisis de regresión correspondiente a la época templada				
	B_0	B_1	r^2	P
Número de folículos	7.59559	0.00956	0.4319	<.0001
Número de cuerpos lúteos	7.03587	0.00403	0.2737	0.0004
Número de embriones recolectados	3.64152	0.00208	0.1855	0.0044

5 CONCLUSIONES

Los niveles de hormona Anti-mülleriana (AMH) y la época del año resultaron ser factores que influyeron en forma significativa sobre variables de respuesta a la superovulación en vacas donadoras. Niveles de AMH superiores a los 400 pg/ml se asociaron a una mayor cantidad de folículos, de cuerpos luteos y de embriones transferibles en vacas superovuladas; mientras que el efecto de la época del año influyó principalmente el número de embriones transferibles, el cual se elevó durante la época de invierno. Adicionalmente, el nivel de AMH resultó ser un predictor significativo de la respuesta a la superovulación, principalmente durante la época templada donde los valores de asociación y de predicción resultaron mayores con respecto al número de folículos, de cuerpos luteos y de embriones transferibles.

Por lo anterior, se propone a la AMH como un marcador endócrino asociado a la respuesta ovárica de ganado bovino sometido a un tratamiento superovulatorio durante la época templada.

Adicionalmente, se recomienda realizar estudios posteriores que cubran un mayor margen de variabilidad, en los cuales se tome en cuenta la reacción intrínseca del animal, involucrando temperatura corporal, frecuencia respiratoria, mediciones más frecuentes de la hormona, etc. Lo anterior es con el objetivo de definir exactamente bajo qué condiciones esta hormona nos puede servir como un indicador de respuesta en vacas donadoras.

6 LITERATURA CITADA

Aké, L.J.R., G. M. E. Alfaro, L. Holy. 1995. Respuesta superovulatoria en ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* bajo condiciones tropicales, y efecto del desarrollo y calidad del embrión sobre el porcentaje de gestación. *Vet. Mex.*26(3):189-193.

Al-Katanani, Y.M., M. Drost, R. L. Monson, J.J. Rutledge, C. E. Krinninger, J. Block, W. Thatcher, P.J. Hansen. 2002. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology.*58:171-182.

Alliston, C.W. and L.C. Ulberg. 1961. Early pregnancy loss in sheep at ambient temperatures of 70° and 90° F as determined by embryo transfer. *J. Anim. Sci.* 1; 20:608-613.

Alves, B.R., T.F. Amaral, S.G. Silva, M.C. Resende, G. Pugliesi, G.C. Castro, J.A.M. Martins, J.M. Silva-Filho, J.R.M. Ruas, A.M. Borges, 2007. Influência da época do ano na resposta superovulatória e produção in vivo de embriões de novilhas holandesas. *Act. Sci. Vet.* 35 (Supl. 3). 1229.

Alzina-López, A., J. C. Farfán-Escalante, E. R. Valencia-Heredia, J. Yokoyama-Kano. 2001. Condición ambiental y su efecto en la temperatura rectal y frecuencia respiratoria en bovinos cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*) del estado de Yucatán, México. *Rev Biomed.* 12:112-121.

Ambrose, J.D., M. Drost, R.L. Monson, J.J. Rutledge, M.L. Leibfried-Rutledge, M.J.Thatcher. 1999. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. *J Dairy Sci.*;82: 2369-2376.

Amundson, J.L., Mader T.L., Rasby, R.J., Hu, Q.S. 2006. Environmental effects on pregnancy rate in beef cattle. *J Anim Sci*; 84: 3415–3420.

Ángulo V.L. y Olivera C.E., 2005. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2005, Coord. Gral de Ganad. SAGARPA. México, Pág.4.

Aréchiga C.F., D.R. Lozano, R.J.M. Silva. F.J. EscobaR, D.R.M. Rincón, C.M.A. López, J.I.1. Aguilera, 1, H. Rodríguez, Z. Cortés, C.A. Medina, Q.S. Saucedo, L. Avendaño, A. Correa, J.L. Espinoza-Villavicencio. 2012. Estrategias para mejorar la función reproductiva de la vaca lechera expuesta a estrés calórico: el uso potencial de los antioxidantes. 2da. Reunión Internacional Conjunta de Manejo de Pastizales y Producción Animal. Zacatecas, México.

Aréchiga-Flores, C.F. y P.J. Hansen. 2003. Efectos climáticos adversos en la función reproductiva de los bovinos. *Vet. Zac.* 2:89-107.

Arias, R.A., T.L. Maderb, P.C. Escobara. 2008. Climatic factors affecting cattle performance in dairy and beef farms. *Arch. Med. Vet.* 40, 7-22.

Armstrong, D. V. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. *J. Dairy Sci.* 77:2044–2050.

Asprón. 2004. Curso de Actualización - Manejo Reproductivo del Ganado Bovino, Extraído el 10 de enero de 2014 desde http://www.ivis.org/continuing_education/short_courses/reproduction_bovine/aspron_es/ivis.pdf.

Avendaño-Reyes, L., F.D. Álvarez-Valenzuela, A. Correa-Calderón, A. Algándar-Sandoval, E. Rodríguez-González, R. Pérez-Velázquez, U. Macías-Cruz, R. Díaz-Molina, P.H. Robinson, J.G. Fadel. 2010. Comparison of three cooling management systems to reduce heat stress in lactating Holstein cows during hot and dry ambient conditions. *Livest. Sci.*, 132:48-52.

Baarends W.M., J.T. Uilenbroek, P. Kramer, J.W. Hoogerbrugge, C.E. Van Leeuwen, A.P. Themmen, J.A. Grootegoed. 1995. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle. *Endocrinology*. 136:4951-4962.

Badinga, L., W.W. Thatcher, Díaz T., M. Drost, D. Wolfelson. 1993. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*. 39:797-810.

Balling, R.C. Jr. 1980. An assessment of the impact of weather conditions on feedlot cattle performance. Center for Agricultural Meteorology and Climatology. University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE. CAMaC Progress report 80-3.

Batista E.O., G.G. Macedo, R.V. Sala, M.D. Ortolan, M.F. SáFilhoC, T.A. Del Valle, E.F. Jesus, R.N. Lopes, F.P. Rennó, P.S. Baruselli. 2010 Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod. Domest. Anim.* 49(3):448-452.

Bavera, G.A. y H.A. Beguet. 2003. Termorregulación corporal y ambientación. Cursos producción bovina de carne. FAV UNRC.

Bényei, B., A. Gáspárdy, S.C. Seh. 2003. Effect of the El Niño phenomen on the ovarian responsive and embryo production of donor cows. *Acta Vet Hung.* 51(2):209-218.

Beede, D., R. Bray, F. Bucklin. 1993. Planifique su estrategia contra el calor. *Ven. Bov.* 23:38-39.

Berry, I.L., M.D. Shanklin, H.D. Johnson. 1964. Dairy shelter design based on milk production decline as affected by temperature and humidity. *Trans ASAE.* 7, 329-331

Bilby, T.R., J. Block, B.C. do Amaral, O. Sa Filho, F.T. Silvestre, P.J. Hansen, C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 2006. Effects of Dietary Unsaturated Fatty Acids on Oocyte Quality and Follicular Development in Lactating Dairy Cows in Summer. *J. Dairy Sci.* 89:3891-3903.

Bó, G.A., M.G. Colazo, M.F. Martínez, J.P. Kastelic, R.J. Mapletoft. 2012. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales

tratados com progestagenos y diferentes ésteres de estradiol. Biotec. Reprod. Bov. (2o Simpósio Int. Reprod. Anim.).

Borges, A.M., C.A.A. Torres, J.R.M. Ruas, V.R. Jr Rocha, G.R. Carvalho. 2001. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 53:595-604.

Brosh, A., Y. Aharoni, A.A. Degen, D. Wright, B.A. Young. 1998. Effects of solar radiation, dietary energy, and time of feeding on thermo-regulatory responses and energy balance in cattle. J Anim Sci 76, 2671-2677.

Burgos, Z. R. y Collier, R. J. 2011. Feeding Strategies for High-Producing Dairy Cows During Periods of Elevated Heat and Humidity. Tri-State Dairy Nutrition Conference, 19 and April 20.

Carvalho J.B.P., Carvalho N.A.T., Reis E.L., Nichi M., Souza A.H., Baruselli P.S. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. Theriogenology, 69:167–75.

Cerón, M., H. Tonhati, C. Costa, C. Solarte, O. Benavides. 2003. Factores de ajuste para producción de leche en bovinos Holstein colombiano. Rev. Colomb. de Cien. Pec. Vol. 16; 26-32.

Church, D. 1993. The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition Corvallis, Zaragoza (España). pp. 525-537.

Colazo M.G y R.J. Mapletoft. 2007. Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. Ciencia vet. Vol. 9. N°1.

Collier, R.J., G.E. Dahl, M.J. VanBaale. 2006. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. J. Dairy Sci. 89, 1244-1253.

CONARGEN.2012.<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Otros/Attachments/2/conargen.pdf>.

Coppock, C.E. 1985. Energy nutrition and metabolism of the lactating dairy cow. J. Dairy Sci. 68:3403-3410.

Critchfield, H. J. 1983. General Climatology. 4th Ed. Prentice Hall Inc. New Jersey, USA. 435.

Crowe A.M., D. Goulding, A. Baguisl, P.M. Boland, J.F. Roche. 1993. Induced ovulation of the first postpartum dominant follicle in beef suckler cows using a GnRH analogue. J. Reprod. Fertil. 99, 551-555.

Cutini, A., Teruel, M., Cabodevila, J. 2000. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. Revista Taurus. 7:28-39.

Da Silva, R.G. 2006. Weather and climate and animal production. In: Update of the guide to agricultural meteorological practices. WMO-No.134

Dalton, J.C., A. Ahmadzadeh, R.C. Chebel, M.W. Overton. 2006. Elevar al Máximo el Desempeño Reproductivo en los Bovinos Lecheros de Alta Producción. CIGAL. Ponencias. Guadalajara, México.

De Vet, A., J.S. Laven, F.H. de Jong, A.P. Themmen, B.C. 2002. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil. Steril.* 77:357–362.

Donaldson, L. E. 1984b. Effect of age of donor cows on embryo production. *Theriogenology*, 21 (6): 963-967.

Drost, M., J.D. Ambrose, M.J. Thatcher, C.K. Cantrell, K.E. Wolfsdorf, J.F. Hasler, W.W. Thatcher. 1999. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology*. 52:1161-1167.

Duica, A., Tovia, N., Grajales H. 2007. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de transplante de embriones bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria, Universidad de La Salle, Bogota, Colombia.* 14:107-124

Durocher, J., N. Morin, P. Blondin. 2006. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology*. 65:102–115.

Dziuk, P. 1975. Transferencia de embriones: una herramienta experimental con aplicaciones prácticas. *Biosci.* 25:102-106.

Fauser B.C., K. Diedrich, P. Devroey. 2008. Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. Hum. Reprod. Update. 14:1–14.

FINANCIERARURAL.2014.[http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Bovino%20\(may%202014\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Bovino%20(may%202014).pdf).

FAO. Food and Agriculture Organization of the United States. 2012. Ganadería - Ganadería Sostenible y Cambio Climático. Extraído el 20 de febrero de 2014 desde <http://Garcia, A.D. 2004. Combatiendo el estrés calórico en la vaca lechera. August 2004. Dairy Science. College of & Biological Sciences / South Dakota State University /usda>.

Fortune, J.E., 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. Biol. of Reprod. 50:225-232.

Gaughan, J.B., T.L. Mader, S.M. Holt, A. Lisle. 2007. A new heat load index for feedlot cattle. J. Anim. Sci. 86(1):226-234.

Gomez, C.J.A.1995. Efecto de la utilización de un producto sincronizador sobre la inducción y sincronización de estros con respecto a la condición corporal en ganado de carne. Tesis de licenciatura. Depto. M.V.Z. ITSON.

González, F.R. 2001. Procedimientos en los programas de transplante de embriones en ganado bovino. Reprod. Bov. Cap. XXV: 391-409.

González-Peña, D.F., D.I. Guerra, A.E. Palacios, R.P. Ortega, A.T. Guillén, J.L.V. Espinoza. 2010. Relación de variables climáticas con la producción de leche el día del control en vacas siboney. En: XX Reunión Internacional sobre Producción de Carne y Leche en Climas Cálidos. Mexicali B.C. p. 269-273.

Grattapaglia, D. é M.E. Ferreira. 2006. "Mapeamento físico e clonagem posicional em plantas". *Marcadores moleculares*. Viçosa: MG, 2006.

Gruijters, M.J., J.A. Visser, A.L. Durlinger, A.P. Themmen. 2003. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol*. 211: 85-90.

Guerreiro, B.M., E.O.S. Batista, L.M. Vieira, M.F. Sá Filho, C.A. Rodrigues, A. Castro Netto, C.R.A. Silveira, B.M. Bayeux, E.A.R. Dias, F.M. Monteiro, M. Accorsi, R.N.V.R. Lopes, P.S. Baruselli. 2014. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest. Anim. Endocrin.* 49:96–104.

Hahn GL. 1986. Compensatory performance in Livestock. In: GP Moberg (ed). Limiting the effects of stress on cattle. Western Regional Research Publication # 009 Research Bulletin 512:7-10.

Hahn, G.L. 1999. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. *J Anim Sci* 11:10-20.

Hahn, G.L., T.L. Mader, R.A. Eigenberg. 2003. Perspectives on development of thermal indices for animal studies and management. *Proc Symp Interactions between climate and animal production*. EAAP Technical series.7:31-44.

Hall, M. 2000. Meet the challenges of heat stress feeding. Howard's dairyman. May. 2000. 344p.

Hansen P.J. and Aréchiga C.F. 1999. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. J. Anim. Sci. 77: 36-50.

Hansen P.J., M. Drost, R.M. Rivera, F.F. Paula-Lopes, Y.M. Al-Katananit, C.E. Krininger III and C.C. Chase, Jr. 2001. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. Theriogenology, 55 (1): 91-103.

Hasler J.F. 2013. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminisces. Theriogenology. Vol;81(1,1):152–169.

Hasler JF, McCauley AD , Schermerhorn EC, Foote RH. 1983. Superovulatory responses of holstein cows. Theriogenology; 19: 83-91.

Herd. D.B. and L.R. Sprott. 1986. Body Condition, Nutrition and Reproduction of Beef Cows. Texas Agricultural Extension Service. B-1526.

Hirayama, H. S. Kageyama, A. Naito, S. Fukuda, T. Fujii, A. Minamihashi. 2012. Prediction of Superovulatory Response in Japanese Black Cattle Using Ultrasound, Plasma Anti-Müllerian Hormone Concentrations and Polymorphism in the Ionotropic Glutamate Receptor AMPA1/GRIA1. J Reprod Dev. 58(3):380-3.

Holm, P., Greve, T. y Willeberg, P. 1987. Description and analysis of factors influencing the response of 449 superovulated donor cows and heifers. *Theriogenology* 27: 238.

Howell, J.L., J.W. Fuquay, A.E. Smith. 1994. Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. *J. Dairy Sci.* 77:735–739.

Ireland, J.J., F. Ward, F. Jimenez-Krassel, J.L. Ireland, G.W. Smith, P. Lonergan, A.C. Evans. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod.* 22:1687–1695.

Johnson, H.D. 1986. The effects of temperature and thermal balance on milk production In: Moberg GP (ed). *Limiting the effects of stress on cattle.* Western Regional Research Publication #009 and Utah Agricultural Experimental Station Research Bulletin 512, Pp 33-45.

Josso, N., R.L. Cate, J.Y. Picard, B. Vigier, N. di clement, C. Wilson, S. Imbeaud, R.B. Pepinsky, D. Guerrier, L. Boussin, L. Legeai, D. Carré-Eusèbe. 1993. Anti-mullerian hormone: the Jost factor. *Recent Progress in Hormone Research.* 48:1–59.

Kanitz, W., F. Becker, F. Schneider, E. Kanitz, C. Leiding, H. P. Nohner, and R. Pöhland. 2002. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 587-599.

Kawamata, M. 1994. Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. *J Vet. Med. Sci.* 56:965–967.

Kevenaar, M.E., M.F. Meerasahib, P. Kramer, B.M. van de Lang-Born, F.H. de Jong, N.P. Groome, A.P. Themmen, J.A. Visser. 2006. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology.* 147:3228-3234.

Khalifa H.H., 1999. Evaluation of some managerial manipulation to alleviate the effect of heat stress on broiler chickens. In: *Proc. 15th Int. Congr. Biometeorol.* 117Pp.

Khalifa H.H., N.A. Ahmad, S.M.T. El-Tantawy, M.A. Kicka, A.M. Dawoud. 2000. Effect of heat acclimation on body fluids and plasma proteins of broilers exposed to acute heat stress. In: *Proc. 11th Conf. Egypt. Soc. Anim. Prod.*

Khalifa, H.H. 2003. Bioclimatology and adaptation of farm animals in a changing climate. In: *Interactions between climate and animal production. Proc. Symp. EAAP Technical series N° 7:15-29.*

Krininger III, C.E., J. Block, Y.M. Al-Katanani, R.M. Rivera, C.C. Chase Jr., P.J. Hansen. 2003. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. *Anim. Reprod. Sci.* 78:13–24.

Larocca, C., I. Lago, A. Fernández, G. Rosés, R. Lanza, P.A.Ugón, D. Boggio. 2005. Alternativas para la sincronización del estro en vaquillonas Holstein. Disponible. Rev. Científ. FCV-LUZ. 15: 512-516.

Lee, M.M. and Donahoe P.K. 1993. Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. Endocr. Rev. 14:152 -164.

Lenz, M.I.; Ramírez, G.F.; Uribe, L.F. 2007. Papel del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) en la regulación de la función ovárica. Biosalud. 6:149-159

Lozano-Domínguez, R.R. y Gonzalez-Padilla R.R. 2003. Efecto del estrés calórico sobre la reproducción de vacas lecheras en sistemas intensivos de producción en México. Memorias del II Simposio Nacional de Infertilidad de la Vaca Lechera. Torreón: UNAM-DEC; 25-48.

Lozano-Domínguez, R.R., M.A. Asprón-Pelayo, C.G. Vásquez-Peláez, E. González-Padilla, C.F. Aréchiga-Flores, 2010. Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. Rev. Mex. Cienc. Pec. 1:189-203.

Lucy, M.C. 2003. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. Reprod. 61:415-27.

Lucy, M.C., J.D. Savio, L. Badinga, R.L. de la Sota, W.W. Thatcher, 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. J Anim Sci 70:3615-3626.

MAFF, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 2000. Climate change and agriculture in the United Kingdom. PB4876. Summary A4.

Malhi, P. S., G. P. Adams, and J. Singh. 2005. Bovine model for the study of reproductive aging in women: Follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biology of Reproduction*. 73: 45-53.

Mapletoft, R.J., Bo, G.A.; Campo, M.R. 1994. Factores que afectan la superovulación en la vaca: consideraciones prácticas. *Bovis, JUN*; (58) 31-49.

Mapletoft R.J., Bó G.A., Adams G.P. 2000. Los avances en la manipulación del ciclo estral en la vaca donante y la receptoras en los programas de transferencia de embriones *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, 28:23-48.

Mapletoft R.J., Steward K.B., Adams G.P. 2002. Avances recientes en la superovulación del ganado. *Reprod Nutr Dev*, 42:1-11.

Marai, I., A. El-Darawany, A. Fadiel and M. Abdel-Hafez. 2008. Reproductive performance traits as affected by heatstress and its alleviation in sheep. *Trop. Subtrop. Agroecosyst*. 8:209-234.

Meat and Livestock Australia. 2002. Understanding excessive heat load in feedlot cattle. On farm tips & tools. Feedlot FL11, Australia.

Medrano, E. A.; Hernández, O. Lamothe, C. Galina, C. S. 1996. Evidence of asynchrony in the onset of signs of oestrus in zebu cattle treated with a progesterone ear implant. *Research in Veterinary Science*. 60:51 - 54.

Monniaux, D., N. di Clemente, J.L. Touzé, C. Belville, C. Rico, M. Bontoux, J.Y. Picard, S. Fabre. 2008. Esteroides intrafolliculares y hormona antimülleriana durante el desarrollo folicular ovárico normal y quístico en la vaca. *Biol Reprod.* 79 : 387-396 .

Monniaux, D., C. Rico, H. Larroque, R. Dalbiès-Tran, C. Médigue, F. Clément, S. Fabre. 2010. Anti-Müllerian hormone, an endocrine predictor of the response to ovarian stimulation in the bovine species. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 38(7-8):465-470.

Murphy B.D., Martinuk D. 1991. Gonadotropina Coriánica Equina. *Endocrine Reviews*, 12:27-44.

Nabenishi, H., S. Takagi, H. Kamata, T. Nishimoto, T. Morita, K. Ashizawa, Y. Tsuzuki. 2012. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. *Mol. Reprod. Dev.* 79:31-40.

Nielsen, M.E., I.A. Rasmussen, M. Fukuda, L.G. Westergaard, C.Y. Andersen. 2010. Concentrations of anti-Müllerian hormone in fluid from small human antral follicles show a negative correlation with CYP19 mRNA expression in the corresponding granulosa cells. *Reprod. Mol. Hum.* 16:637-643.

NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration). 1976. Livestock hot weather stress. *Oper. Man. Lett.* C-31-76. Kansas City, MO. NOAA, Washington, DC.

NRC, National Research Council. 1981. Effect of environment on nutrient requirement of domestic animals. National Academy Press. Washington DC, USA.

Ochoa J.C., Ramírez R.R.A., Piccardi M.B., Bó G.A., Tríbulo R. J. 2009. Influencia de la estación en la producción de embriones en donantes de embriones de raza para carne. VIII Simposio Internacional de Reproducción Bovina, Córdoba, Argentina, 26, 27 y 28 de Septiembre. CD.

Orellana, J. y Peralta E. 2007. Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies, Zamorano, Honduras.

Palma G. 2001. Transferencia de los embriones. Biotecnología de la Reproducción, capítulo VII, Ediciones INTA, Balcarce, Argentina, 133-148.

Phillips C.J.C. 2003. Principios de Producción bovina, Ed. Acribia S.A Zaragoza (España).

Putney D., S. Mullins, W.W. Thatcher, M. Drost, T.S. Gross. 1989. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. Anim. Reprod. Sci. 19:37-51.

Rangel-Portal, L., A. Lassala-Irueste, C. Gutiérrez-Aguilar. 2010. Fisiología veterinaria e introducción a la fisiología de los procesos productivos. D.R. Universidad Autónoma de México. (1ra. ed.) México D.F. Pp.469-479.

Rico, C., S. Fabre, C. Médigue, N. di Clemente, F. Clément, M. Bontoux, J.L. Touzé, M. Dupont, E. Briant, B. Rémy, J.F. Beckers, D. Monniaux. 2009. Anti-müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive

follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow.. Biol. Reprod. 80:50-59.

Robertshaw, D. 1981. The environmental physiology of animal production. In: Clark, J.A. (ed.), environmental aspects of housing for animal production. Butterworth, London. pp. 3-17.

Ruiz-Arboleda J.L., L.F. Uribe-Velásquez, J.H. Osorio. 2011. Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) en la reproducción de la hembra bovina. Vet. Zootec. 5(2):68-81.

Sakatani, M., S. Kobayashi y M. Takahashi. 2004. Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. Mol Reprod Dev. 67:77-82.

Sartori S., Sartor-Bergfelt R., Mertens S.A., Guenther J.N., Parrish J.J., Wiltbank M.C. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in Winter. J Dairy Sci, 85:2803-2812.

Sánchez, M. 2013. El gen de la prolactina y su receptor como marcador molecular asociado a la eficiencia productiva de vacas holstein en un clima calido. Tesis de licenciatura. Depto. M.V.Z. ITSON.

SAS. 2009. SAS/STAT Users Guide, version 9.4, Cary, NC: SAS Institute Inc. USA.

SE, (2012) Secretaria de economía. Dirección General de Industrias Basicas. Análisis del sector lácteo en Mexico. pp 29-31 (revisado 12/05/2014). Disponible en:http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/analisis_sector_lacteo.pdf.

Seifer, D.B., D.T. MacLaughlin, A.S. Penzias, H.R. Behrman, L. Asmundson, P.K. Donahoe, R.V.Jr. Haning, S.D. Flynn. 1993. Gonadotropin-releasing hormone agonist-induced differences in granulosa cell cycle kinetics are associated with alterations in follicular fluid müllerian-inhibiting substance and androgen content.. J. Clin. Endocrinol. Metab. 76 : 711 714

Shiao, T.F., J.C. Chen, D.W. Yang, S.N. Lee, C.F. Lee, W.T. Cheng. 2010. Feasibility assessment of a tunnel-ventilated, water-padded barn on alleviation of heat stress for lactating Holstein cows in a humid area. J. Dairy Sci. 94:5393-5404.

Smith, T., A. Chapa, S. Willard, C. Herndon, R. Williams, J. Crouch, T. Riley, D. Pogue. 2006. Evaporative tunnel cooling of dairy cows in the southeast II: Impact on lactation performance. J. Dairy Sci. 89:3915–3923.

Souza, A. H., A. Gümen, E. P. Silva, A.P. Cunha, J. N. Guenther, C. M. Peto, D. Z Caraviello and M.C. Wiltbank. 2007. Supplementation with estradiol-17 β before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows J. Dairy. Sci. 90:4623-4634.

Squires, E. 2006. Endocrinología animal aplicada. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. P 169-175,190-193.

Sterling M, Jull G, Vicenzino B, Kenardy J, Darnell R. 2005. Physical and psychological factors predict outcome following whiplash injury. *Pain*. 114:141–8

Suadsong, S., J. Suwimonteerabutr, P. Virakul, S. Chanpongsang, A. Kunavongkrit. 2008. Effect of improved cooling system on reproduction and lactation in dairy cows under tropical conditions. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 21:555-560.

Sunderland, S.J., M.A. Crowe, M.P. Boland, J.F. Roche, J.J. Ireland. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 101: 547-555.

Thom, E.C. 1959. The discomfort index. *Weatherwise* 12, 57-59.

Tomaszewski, M.A., M.A. De-Haan, J.A. Thompson, E.R. Jordan. 2005. The Impact of Cooling Ponds in North Central Texas on Dairy Farm Performance. *J. Dairy Sci.* 88(6): 2281-2286.

Tonhati, H., R.B. Lobo, H.N. Oliveira. 1999. Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows. *Theriogenology*. 51:1151–1156.

Tríbulo, A., D. Rogan, H. Tribulo, R. Tribulo, R.V. Alasino, D. Beltramo, I. Bianco, R.J. Mapletoft, G.A. Bó. 2011. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim. Reprod. Sci.* 129:7-13.

Trout, J.P., L.R. McDowell, P.J. Hansen. 1998. Characteristics of the oestrous cycle and antioxidant status of lactating Holstein cows exposed to stress. *J Dairy Sci.* 81:1244–50.

Valtorta, S.E., M.R. Gallardo, H.C. Castro, M.E. Castelli. 1996. Artificial shade and supplementation effects on grazing dairy cows in Argentina. *Trans. Amer. Soc. Agric. Eng.* 139:233.

Vasconcelos, J.L., D.G. Demétrio, R.M. Santos, J.R. Chiari, C.A. Rodrigues, O.G. Sá Filho. 2006. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology.* 65:192-200.

Vieira, L.M., C.A. Rodrigues, M.F. Mendanha, M.F. Sá Filho, J.N.S. Sales, A.H. Souza, J.E.P. Santos, P.S. Baruselli. 2014. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology.* 20:1-9.

Visser, J.A., F.H. de Jong, J.S. Laven, A.P. Themmen. 2006. Hormona anti-Mülleriana: un nuevo marcador de la función ovárica. *Reprod.* 131:1-9.

Vizuet A. 2012. Manejo y alimentación de las vacas donadoras de embriones de la raza Holstein Friesian . Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela de Ingeniería zootécnica.

Wang, J.P., D.P. Bu, J.Q. Wang, X.K. Huo, T.J. Guo, H.Y. Wei, L.Y. Zhou, R.R. Rastani, L.H. Baumgard and F.D.L. 2010. Effect of saturated fatty acid

supplementation on production and metabolism indices in heat-stressed mid-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:4121-4127.

Webb, R., R.G. Gosden, E.E. Telfer, R.M. Moor. 1999. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *J. Anim. Sci.* 68: 257-284.

West, J.W. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86:2131-2144.

Wolfenson, D., W.W. Thatcher, L. Badinga, J.D. Savio, R. Meidan, B.J. Lew, R. Braw-Tal, A. Berman. 1995. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol Reprod.* 52:1106-1113.

Yabuta-Osorio, A. K. 2001. El estrés calórico en ganado lechero, ELSEVIER, México.

Zavala, L. 2011. Crían ganado cebuino siete de cada diez unidades de producción pecuariasganaderia. Union Campesina. Extraído el 20 de febrero de 2014 desde:http://www.unioncampesina.com/noticias/index.php?option=com_content&view=article&id=7387:crian-ganado-cebuino-siete-de-cada-diez-unidades-de-produccionpecuarias&catid=56:agrarias&Itemid=86.

Zerón, Y., A. Ocheretny, O. Kedar, A. Borochoy, D. Sklan, and A. Arav. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reprod.* 121:447-454.