



**UNIVERSIDAD VERACRUZANA**

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**TASA DE GESTACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS  
CRIOPRESERVADOS PRODUCIDOS MEDIANTE  
OVULACIÓN MÚLTIPLE USANDO DIFERENTES DOSIS  
DE FSH Y eCG**

PRESENTADA COMO REQUISITO  
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA:

**M. C. FERNANDO NARANJO CHACÓN**

DIRECTOR:

**DR. FELIPE MONTIEL PALACIOS**

CO-DIRECTORA:

**DRA. CONCEPCIÓN DEL CARMEN AHUJA AGUIRRE**

DIRECTOR EXTERNO:

**PhD. RODOLFO CANSECO SEDANO**

H. VERACRUZ, VER.

OCTUBRE, 2019

El presente trabajo de tesis intitulado: **Tasa de gestación de embriones bovinos criopreservados producidos mediante ovulación múltiple usando diferentes dosis de FSH y eCG**, presentado por el C. **MC. Fernando Naranjo Chacón** ha sido aprobado por sus **ASESORES**, como requisito parcial para obtener el grado de:

## DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

### COMITÉ TUTORIAL:



---

DR. FELIPE MONTIEL PALACIOS  
DIRECTOR DE TESIS



---

DRA. CONCEPCIÓN DEL CARMEN AHUJA AGUIRRE  
CO-DIRECTORA



---

PhD. RODOLFO CANSECO SEDANO  
DIRECTOR EXTERNO



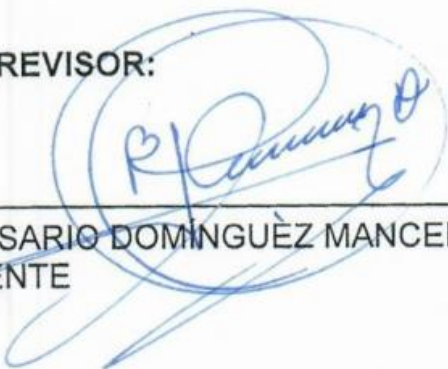
---

DRA. BERTHA CLEMENTINA HERNÁNDEZ CRUZ  
ASESOR

El presente trabajo de tesis intitulado: **Tasa de gestación de embriones bovinos criopreservados producidos mediante ovulación múltiple usando diferentes dosis de FSH Y eCG**, presentado por el C. MC. **FERNANDO NARANJO CHACÓN** ha sido aprobado por sus **COMITÉ REVISOR**, como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**COMITÉ REVISOR:**




DR. BELISARIO DOMÍNGUEZ MANCERA  
PRESIDENTE



DRA. DORA ROMERO SALAS  
SECRETARIA



DR. FELIPE GALLARDO LÓPEZ  
VOCAL 1



DR. OTTO RAÚL LEYVA OVALLE  
VOCAL 2



DR. GENARO ALFONSO CORIA ÁVILA  
VOCAL 3



Universidad Veracruzana

# Doctorado en Ciencias Agropecuarias Córdoba-Veracruz-Xalapa



Doctorado en  
Ciencias Agropecuarias  
Universidad Veracruzana

## Dictamen de Evaluación del Documento de Tesis

C. MC. FERNANDO NARANJO CHACÓN  
Estudiante del Doctorado en Ciencias Agropecuarias  
Sede Veracruz

PRESENTE

Por este conducto, se hace de su conocimiento que el Jurado Doctoral ha evaluado su Tesis Doctoral intitulada "Tasa de gestación de embriones bovinos criopreservados producidos mediante ovulación múltiple usando diferentes dosis de FSH Y eCG" y ha emitido el veredicto de APROBADO, ya que si reúne los elementos suficientes de fondo y forma.

Se autoriza continuar con los trámites administrativos para la obtención del grado en la Coordinación del Doctorado en Ciencias Agropecuarias Sede Veracruz de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Región Veracruz.

H. Veracruz, Ver. a 25 de Septiembre de 2019.  
"Lis de Veracruz: Arte, Ciencia, Luz"

Presidente **Dr. Belisario Domínguez Mancera**

Secretario **Dra. Dora Romero Salas**

Vocal 1 **Dr. Felipe Gallardo López**

Vocal 2 **Dr. Otto Raúl Leyva Ovalle**

Vocal 3 **Dr. Genaro Alfonso Coria Ávila**

## **DEDICATORIAS**

A **Dios** por permitirme concluir una meta más en mi vida, por estar siempre en los momentos difíciles, guiarme en cada decisión y no abandonarme.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT), por la beca de manutención otorgada durante los estudios del doctorado.

A la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** de la **Universidad Veracruzana** por permitirme realizar mis estudios en el **Doctorado en Ciencias Agropecuarias**.

Al **Dr. Felipe Montiel Palacios**, por aceptar ser mi tutor en el proyecto, brindarme su amistad y permitirme trabajar con el proyecto 18547 “Servicios en Reproducción Animal”.

A la **Dra. Concepción del Carmen Ahuja Aguirre**, por sus consejos, apoyo, dedicación y las interminables sugerencias, correcciones y regaños para obtener un producto de calidad, lo cual ha influenciado directamente en mi formación.

Al **Dr. Rodolfo Canseco Sedano**, por su gran amistad, las enseñanzas, permitirme ser parte de su equipo de trabajo, el apoyo invaluable en las fases de campo que se realizaron en este proyecto, las múltiples visitas para aclaraciones, las sugerencias, así como participar en sus proyectos particulares y alentarme a realizar el doctorado.

Al **Dr. Oscar Enrique Zárate Guevara**, por su amistad, el apoyo brindado, la capacitación, el entusiasmo y la gran participación en cada una de las etapas de esta investigación.

A mis amigos y compañeros **Gustavo, Vicente, Itziar, Kayser** e **Isaac** por brindarme su amistad y apoyo, además que siempre estuvieron dispuestos a apoyarme durante el estudio.

A toda la familia **Aguirre Barradas** de las Choapas, Ver., por su amistad, amabilidad, cariño y por haberme permitido realizar esta investigación en su unidad de producción.

Al Sr. **Ramón Fuster**, por permitirme realizar esta investigación en su unidad de producción.

## RESUMEN

La ovulación múltiple (OM) es el incremento del número fisiológico de ovulaciones propias de la especie inducido artificialmente mediante el uso de hormonas exógenas. La hormona folículo estimulante (FSH) y la gonadotropina coriónica equina (eCG) se utilizan en protocolos de OM para incrementar el número de ovulaciones y de embriones viables obtenidos. El promedio internacional de embriones obtenidos por donadora por OM es 6.5. Por otro lado, para conservar embriones bovinos por tiempo indefinido se utiliza la criopreservación por congelación lenta (CL) o por vitrificación (VT), con las cuales se han reportado tasas de gestación (TG) de 35 a 55 % y 35 a 65 %, respectivamente. El objetivo del estudio fue evaluar la producción de embriones después de la OM en donadoras *Bos taurus* x *Bos indicus* de diferente edad y en donadoras tratadas con dosis variadas de FSH y eCG, así como determinar la TG de los embriones obtenidos criopreservados por VT y CL. El estudio se dividió en tres experimentos. Exp. 1: se evaluó la producción de embriones en donadoras de edad media y madura sometidas a un mismo protocolo de OM con FSH y eCG. Exp. 2: se evaluó la producción de embriones con tres protocolos de OM utilizando FSH y eCG en diferentes dosis. Exp. 3: se determinó la TG para los embriones producidos criopreservados por VT y CL. Los resultados de OM y TG se analizaron por ANOVA y  $\chi^2$ , respectivamente (STATISTICA V10). Se obtuvieron más embriones en vacas de edad mediana que madura ( $P < 0.05$ ). No hubo diferencia en el número de embriones obtenidos con los tres protocolos de OM utilizados ( $P > 0.05$ ). Se obtuvo TG similar para embriones criopreservados por VT y CL (40 %) ( $P > 0.05$ ). En conclusión, debe evitarse incluir donadoras  $\geq 8$  años de edad en programas de OM. Los tres protocolos de OM evaluados fueron eficaces para producir embriones *in vivo* y ambos métodos de criopreservación permitieron obtener similar TG. Con la finalidad de procurar el bienestar de los animales sometidos a OM, se recomienda utilizar cualquiera de los dos protocolos evaluados que incluyen cuatro aplicaciones de FSH o FSH/LH.

**Palabras clave:** biotecnologías reproductivas, FSH, LH, eCG, superovulación en bovinos

## ABSTRACT

Multiple ovulation (MO) is the increase in the physiological number of ovulations of a given species that is artificially induced with the use of exogenous hormones. Follicle stimulating hormone (FSH) and equine chorionic gonadotropin (eCG) are used in MO protocols to increase the number of ovulations and viable embryos obtained. The international average of embryos obtained by donor by MO is 6.5. On the other hand, to preserve bovine embryos indefinitely, cryopreservation by slow freezing (SF) and by vitrification (VT) are used, resulting in pregnancy rates (PR) of 35 to 55 % and 35 to 65 %, respectively. The objective of the study was to evaluate embryo production after MO in *Bos taurus* x *Bos indicus* donors of different age and in donors treated with varied doses of FSH and eCG, as well as to determine PR of the embryos obtained that were cryopreserved by VT and SF. The study was divided into three experiments. Exp. 1: embryo production was evaluated in middle-aged and mature donors treated with the same MO protocol with FSH and eCG. Exp. 2: embryo production was evaluated with three MO protocols using FSH and eCG in different doses. Exp. 3: PR was determined for the recovered embryos that were cryopreserved by VT and SF. The results of MO and PR were analyzed by ANOVA and  $\chi^2$ , respectively (STATISTICA V10). More embryos were obtained in middle-aged than in mature cows ( $P < 0.05$ ). There was no difference in the number of embryos obtained with the three MO protocols used ( $P > 0.05$ ). Similar PR was obtained for embryos cryopreserved by VT and SF (40%) ( $P > 0.05$ ). In conclusion, donors  $\geq 8$  years of age should not be included in OM programs. The three OM protocols evaluated were effective in producing embryos *in vivo* and both cryopreservation methods allowed obtaining similar PR. In order to pursue the welfare of animals subjected to OM, it is recommended to use any of the two protocols evaluated that include four applications of FSH or FSH / LH.

**Keywords:** eCG, FSH, LH, reproductive biotechnologies, superovulation in cattle



## ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIAS .....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE GENERAL .....</b>	<b>ix</b>
<b>CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y hormonas reproductivas en la hembra bovina .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.1. Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.2. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1.3. Gonadotropinas .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.3.1. Hormona folículo estimulante (FSH) .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.3.2. Hormona luteinizante (LH).....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.4. Gonadotropina coriónica equina (eCG) .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Dinámica folicular .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3. Ciclo estrual .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.1. Proestro.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.2. Estro o celo .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.3. Metaestro .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.4. Diestro.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Ovulación múltiple (OM).....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.1. Protocolos hormonales para inducción de ovulación múltiple.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5. Criopreservación de embriones .....</b>	<b>25</b>

2.5.1. Congelación lenta (CL) .....	28
2.5.2. Vitrificación (VT) .....	28
2.6. Transferencia de embriones (TE) .....	29
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	31
4. BIBLIOGRAFÍA.....	33
CAPÍTULO II. ARTÍCULO 1.....	43
Embryo production in middle-aged and mature <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i> cows induced to multiple ovulation in a tropical environment .....	43
CAPÍTULO III. ARTÍCULO 2. ....	50
Embryo production after superovulation of bovine donors with a reduced number of FSH applications and increased eCG dose .....	50
CAPÍTULO IV. ARTÍCULO 3. ....	65
Tasa de gestación con embriones bovinos criopreservados por congelación lenta y vitrificación en Veracruz, México .....	65
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....	70
1. DISCUSIÓN GENERAL.....	70
2. CONCLUSIONES GENERALES.....	75
3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

# CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

## 1. INTRODUCCIÓN

La demanda de bovinos de alto valor genético ha impulsado el uso de biotecnologías reproductivas en todo el mundo (Oliveira *et al.*, 2014). Técnicas como la ovulación múltiple (OM), la transferencia de embriones (TE) y la criopreservación se utilizan ampliamente para acelerar el mejoramiento genético de los hatos ganaderos, porque permiten la selección de los mejores animales y la reducción de los intervalos generacionales (Baruselli *et al.*, 2006; Mapletoft y Bó, 2011; Bó *et al.*, 2018).

Desde 1970 se ha practicado la inducción de OM en donadoras bovinas mediante la aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG) u hormona folículo estimulante (FSH) (Hasler, 2014), con el objetivo de lograr el mayor número de ovulaciones que resulten en embriones viables con alta probabilidad de generar una gestación (Bó *et al.*, 2018). En los últimos años las investigaciones sobre OM se han orientado en buscar nuevos tratamientos que requieran menor manejo de la donadora, sin que se afecte la viabilidad, el promedio y la calidad de los embriones obtenidos (Carvalho *et al.*, 2014).

Para los tratamientos de inducción a OM se debe tomar en cuenta que existen diferencias importantes en la fisiología y en el comportamiento reproductivo entre hembras (Bó y Mapletoft, 2014), así como factores externos, que provocan una variabilidad en el número de embriones recolectados por donadora, y que afectan la eficiencia de los tratamientos y la producción de embriones (Hasler, 2014; Wohlfres-Viana *et al.*, 2019). En los últimos 40 años el promedio de embriones viables por recolección por donadora se ha mantenido en seis a nivel mundial (Mikkola y Taponen, 2017). Sin embargo, se han logrado avances en el control del desarrollo folicular, del momento de la ovulación, de la inseminación a tiempo fijo y de la criopreservación de embriones (Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2006; Do *et al.*, 2018).

La criopreservación permite almacenar por tiempo indefinido los embriones bovinos producidos por OM, principalmente cuando no se dispone de suficientes receptoras para transferirlos, además de que facilita el transporte de material genético por todo el mundo

(D'Alessandro y Martemucci, 2016). Los métodos de criopreservación de embriones bovinos más utilizados son la congelación lenta (CL) y la vitrificación (VT) (Do *et al.*, 2018). La mayoría de los embriones obtenidos por OM son criopreservados por CL, y después de su transferencia se han reportado tasas de gestación de 35 a 55 % (Chase *et al.*, 2009; Ledezma *et al.*, 2011; Hasler, 2014). Sin embargo, con la transferencia de embriones bovinos vitrificados se han obtenido tasas de gestación que van de 35 a 65 % (Youngs, 2011; Hasler, 2014; Morató y Mogas, 2014).

Por otro lado, en el trópico mexicano el ganado bovino es comúnmente manejado dentro del sistema tradicional de doble propósito, utilizando cruza *Bos taurus* x *Bos indicus* para la producción de leche y carne. No obstante, en estas hembras generalmente no se practica la inducción de OM, por lo que es escasa la información referente a la producción de embriones en este tipo de ganado. Por lo tanto, los objetivos de esta investigación fueron 1) evaluar el efecto del uso de diferentes dosis de FSH y eCG en tratamientos de inducción a OM en donadoras bovinas Holando Cebú (5/8 Holstein x 3/8 Cebú) y Suiz-Bú (5/8 Suizo x 3/8 Cebú) sobre la producción de embriones, y determinar la tasa de gestación de los embriones producidos que fueron criopreservados por CL y VT.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y hormonas reproductivas en la hembra bovina

Para que todos los programas de inducción a OM y de TE sean exitosos, se debe tener un amplio conocimiento de la endocrinología y fisiología reproductiva de la hembra bovina, tomar en cuenta todos los componentes del aparato reproductor femenino, así como los mecanismos hormonales que controlan el ciclo estrual de las vacas (Jin y Yang, 2014).

La regulación fisiológica de la reproducción de los mamíferos se produce a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Segner *et al.*, 2017); este eje es el componente hormonal de un sistema de intercomunicación neural y endocrina cuya función es regular la fertilidad (Kaprra y Huhtaniemi, 2018), y que se encuentra bajo el control del sistema nervioso central (Fink, 2015).

El eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-gónadas integra información de señales extrínsecas e intrínsecas para asignar energía y nutrientes a la reproducción, ya sea para sincronizar eventos relacionados con ésta, la diferenciación sexual, el tiempo de maduración y la secreción de hormonas sexuales (Jin y Yang, 2014; Segner *et al.*, 2017).

#### 2.1.1. Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas es el responsable, tanto en el macho como en la hembra, del control de todos los procesos reproductivos (Montaño y Cortés, 2016), cumpliendo con dos funciones primordiales: esteroidogénesis (síntesis de hormonas esteroideas responsables de la diferenciación y la maduración sexual) y gametogénesis (producción de los gametos) (Arce *et al.*, 2006; Echeverría, 2006).

El hipotálamo se encuentra situado en una porción del diencefalo; está limitado hacia adelante por el quiasma óptico, hacia atrás por los cuerpos mamilares, a los lados por surcos de los lóbulos temporales, hacia arriba por el tálamo y hacia abajo por la glándula hipófisis (Ramírez y Lílido, 2006).

El hipotálamo es el centro nervioso que coordina numerosas actividades en el organismo. En la reproducción, la regulación neuroendocrina establece que el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas inicia con la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

desde las neuronas parvocelulares neurosecretoras localizadas en el núcleo arcuato, el núcleo periventricular, el paraventricular y el área preóptica del hipotálamo (Gómez *et al.*, 2014). En las últimas dos décadas se han identificado a las kisspeptinas y a los péptidos RFamida (RFRP) como los neuropéptidos que actúan como reguladores esenciales en el control de la secreción de GnRH, con un efecto estimulante e inhibitorio, respectivamente (Hu *et al.*, 2019).

En el caso de la kisspeptina, evidencias en animales sugieren que actúa directamente sobre las neuronas de GnRH y estimula su liberación después de la interacción con su receptor, provocando una estimulación aún mayor de los gonadotrofos en la glándula pituitaria para secretar FSH y LH a la circulación periférica (Pinilla *et al.*, 2012; Skorupskaite *et al.*, 2014; Zeeshan Javed, 2015).

La hipófisis o glándula pituitaria está situada en una depresión de la cara superior del hueso esfenoideos, denominada silla turca o fosa hipofisiaria; se encuentra conectada al hipotálamo por medio de un complejo sistema vascular denominado sistema portal hipotálamo-hipofisiario (Arce *et al.*, 2006). La hipófisis está formada por dos porciones: adenohipófisis y neurohipófisis; la adenohipófisis constituye aproximadamente el 80 % del total de la glándula y se encarga de la producción de gonadotropinas, entre otras hormonas, así como de su liberación al torrente circulatorio para que actúen sobre el ovario; su función depende de la GnRH que es producida y liberada por el hipotálamo (Andújar *et al.*, 2012).

La neurohipófisis o lóbulo posterior de la hipófisis está formada por los axones distales de neuronas del hipotálamo, lo que constituye a tejido nervioso (Biagetti *et al.*, 2008). En la neurohipófisis no se sintetiza ninguna hormona, sin embargo, se almacena hormona antidiurética (ADH) y oxitocina que son sintetizadas en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, las cuales viajan a través de los axones nerviosos hasta la neurohipófisis para su posterior liberación al torrente circulatorio (Fernández *et al.*, 2012).

### **2.1.2. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)**

La GnRH es considerada como la hormona que regula los procesos reproductivos en los mamíferos (Boonthum *et al.*, 2017). Es un decapeptido con peso molecular de 1183 daltons (Vantman y Vega, 2010). Las neuronas productoras de GnRH se encuentran dispersas por

todo el hipotálamo, siendo más abundantes en el núcleo arcuato y en el hipotálamo anterior; la mayor parte de estas neuronas proyectan sobre la eminencia media, liberando la GnRH en forma de pulsos al sistema portal hipofisiario, desde donde es transportada a la adenohipófisis (Arce *et al.*, 2006; Serdar *et al.*, 2009; Andújar *et al.*, 2012).

En la adenohipófisis, la GnRH actúa sobre los gonadotropos uniéndose a su receptor (GnRH-R), que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (Rodríguez, 2016), y ejerce un efecto diferenciado sobre las concentraciones de ARNm de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las gonadotropinas, que dependen de la amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH (Henaó *et al.*, 2016). Una vez unida a su receptor en la adenohipófisis, la GnRH activa la proteína G que estimula la síntesis de fosfoinosítidos, los cuales bajo la acción de la fosfolipasa C intercelular se transforman en inositol trifosfato y diacilglicerol (Kaiser *et al.*, 1997); este último activa a la proteinaquinasa C, a través de la cual la GnRH estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas FSH y hormona luteinizante (LH) al torrente sanguíneo (Gogce *et al.*, 2015; Henaó *et al.*, 2016; Boonthum *et al.*, 2017). Las gonadotropinas a su vez viajan hasta los ovarios para inducir la gametogénesis, la síntesis y la secreción de hormonas esteroideas, ocurriendo así la regulación de la reproducción a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Gómez *et al.*, 2014).

### **2.1.3. Gonadotropinas**

Las gonadotropinas son hormonas hipofisiarias reguladas por la acción de factores hipotalámicos (Jadhao *et al.*, 2017); éstas regulan las funciones gonadales del macho y la hembra, la síntesis de hormonas sexuales, así como las diferencias entre las etapas reproductivas (Potau y Carreño de Puig, 2007). Las gonadotropinas son la FSH y LH; ambas hormonas tienen las cadenas péptidas  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales están unidas por enlaces de hidrógeno; en la cadena  $\alpha$  son casi idénticas, por lo que es la cadena  $\beta$  la que proporciona la especificidad para las interacciones con sus receptores (Roger *et al.*, 1993).

Las gonadotropinas juegan un papel importante en los mamíferos, ya que regulan la gametogénesis y la esteroidogénesis gonadal mediante la unión de sus receptores (FSH-R y LH-R) localizados en la membrana de las células gonadales (Kobayashi *et al.*, 2008). En la

hembra, la FSH actúa sobre el desarrollo de los folículos ováricos, mientras que la LH estimula su maduración y ovulación (Salgado *et al.*, 2010).

#### **2.1.3.1. Hormona folículo estimulante (FSH)**

La FSH está implicada en el inicio de la gametogénesis y en la regulación del crecimiento gonadal (Mateos *et al.*, 2002), dado que promueve el crecimiento de los folículos ováricos en la hembra mamífera (Hafez y Hafez, 2000; Miller *et al.*, 2002). Esta hormona es una glucoproteína que se produce en los gonadotropos de la adenohipófisis y se libera por las pulsaciones de la GnRH (Kim *et al.*, 2013). Se han demostrado dos picos de FSH durante el ciclo estrual bovino, siendo el primero el que coincide con el periodo pre-ovulatorio y el pico de LH, y el segundo el que inicia 12 a 24 h después del inicio del periodo pre-ovulatorio (Velásquez *et al.*, 2009).

La FSH está compuesta por dos subunidades diferentes denominadas  $\alpha$  y  $\beta$  (Salas *et al.*, 1994). La subunidad  $\alpha$  de la FSH es similar a la de la LH, mientras que las subunidades  $\beta$  difieren entre ellas y son las que dan la especificidad biológica e inmunológica (Santi *et al.*, 2018). El peso molecular de la FSH aproximadamente es de 33 kDa, variando con la especie y la longitud de los oligosacáridos agregados (Santi *et al.*, 2018).

La FSH actúa directamente sobre los folículos ováricos, promoviendo el desarrollo de los ovocitos en ellos contenidos; además, participa junto con la LH para inducir la síntesis de estradiol en los folículos en crecimiento hasta alcanzar niveles altos en sangre, mismos que, junto con la inhibina producida en las células de la granulosa, actúan inhibiendo la secreción de FSH debido a retroalimentación negativa (Prieto y Velázquez, 2002).

Recientemente los protocolos de OM utilizan FSH extraída de hipófisis porcina u ovina (Mikkola y Taponen, 2017). La acción biológica media que tiene la FSH es de 5 h o menos (Mapletoft y Bó, 2012). Debido a esto, en los tratamientos de OM la aplicación de FSH se realiza dos veces por día (cada 12 h) vía intramuscular (im) durante cuatro o cinco días (Bó y Mapletoft, 2014).

En las últimas tres décadas de investigación relacionadas con la inducción de OM en donadoras, se ha demostrado que el uso de FSH exógena incrementa el número de ovocitos disponibles para ser fecundados y para generar más embriones viables, tanto en novillas



como en vacas (Armstrong *et al.*, 1994; Sirard *et al.*, 2007; Bó *et al.*, 2018). La eficiencia del uso de la FSH en la inducción de OM se asocia principalmente a la forma de su aplicación en el protocolo (iniciando el día 4 del tratamiento y cada 12 h), dando como efecto positivo el crecimiento folicular (Sirard *et al.*, 2007).

### **2.1.3.2. Hormona luteinizante (LH)**

La LH es una glucoproteína sintetizada en los gonadotropos de la adenohipófisis (Marín *et al.*, 2004). Se compone por una subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  con un peso molecular de 30,000 daltons y su acción biológica es de 30 minutos (Huang *et al.*, 2015). Al igual que la FSH, la hipófisis libera LH debido a las pulsaciones de GnRH (Legan *et al.*, 2015). Los niveles basales de LH actúan con la FSH para el desarrollo terminal del folículo y el incremento en la síntesis y la secreción de estrógenos de los folículos ováricos, los cuales son responsables de inducir el estro y la ovulación (Williams y Amstalden, 2010; Santos Echeverría *et al.*, 2014).

Las células de la granulosa y teca interna de los folículos ováricos contienen receptores de LH y mediante su estímulo producen andrógenos; éstos luego pasan a través de la membrana basal de las células de la granulosa, donde mediante la acción de la FSH se induce su aromatización para transformarse en estrógenos que son liberados al antro folicular y de allí a la circulación general (Beg y Ginther, 2006; Peter *et al.*, 2009; Forde *et al.*, 2011).

El pico preovulatorio de LH induce una cadena de reacciones enzimáticas que terminará la ruptura de la pared folicular y la ovulación; además, este pico preovulatorio inducirá la activación del ovocito para que continúe con la meiosis y estimulará la formación del cuerpo lúteo funcional, que a su vez secretará progesterona (Prieto y Velázquez, 2002; Franco y Uribe, 2012).

### **2.1.4. Gonadotropina coriónica equina (eCG)**

La eCG se sintetiza en la placenta de yeguas, específicamente en las copas endometriales (Mellisho *et al.*, 2007), y cumple funciones biológicas similares a la FSH y LH en los bovinos. La eCG tiene una estructura de glucoproteína con subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  similares a la FSH y LH, pero con mayor contenido de carbohidratos (ácido siálico) (Hafez y Hafez, 2000; Chen *et al.*, 2016), lo que le confiere una vida media de 4 a 6 días (Shabankareh *et al.*,

2012). Por lo tanto, la aplicación de esta hormona tiene efectos sobre el ovario por más tiempo, siendo predominante la función de la FSH para estimular el desarrollo de los folículos (Mellisho *et al.*, 2007).

El aislamiento de la eCG del suero sanguíneo de la yegua se realiza cuando tiene de 36 a 70 días de gestación; esta hormona tiene un peso molecular aproximado de 700,000 daltons, lo que la hace circular en la sangre y no en la orina (Mellisho *et al.*, 2007). El uso de esta hormona ha sido evaluado para mejorar la reproducción en bovinos, porque induce el desarrollo de un folículo más grande que se traducirá en un cuerpo lúteo con mayor producción de progesterona (Pulley *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, 2015). De igual manera se ha evaluado el uso de la eCG para inducir OM en bovinos, ovejas, cerdos, cabras e incluso en ratas (Jackson *et al.*, 2006).

En 1978 se evaluó el uso de la eCG y de extractos de pituitaria que contenían FSH más LH (20 %), con la finalidad de conocer el efecto de estos dos extractos en cuanto a la producción de embriones viables, pero no se encontraron diferencias (Elsden *et al.*, 1978; Goulding *et al.*, 1996; Bó y Mapletoft, 2014). Sin embargo, debido a la estimulación prolongada que ocasiona la eCG en los ovarios, se decidió utilizar el extracto de pituitaria (porcina y caprina) para la inducción a OM (Murphy y Martinuk, 1991). Así, aunque se substituyó la FSH por la eCG, ésta última se sigue usando en protocolos de inducción de OM en combinación con la FSH, para aumentar el número de embriones viables (Bryan *et al.*, 2013).

## **2.2. Dinámica folicular**

En la hembra bovina, la dinámica folicular desencadena los procesos reproductivos y las fases del ciclo estrual, y es regulada por factores que se interrelacionan para permitir que se presente la ovulación (Delgado *et al.*, 2011). Estos procesos son influenciados por las hormonas sexuales involucradas en el ciclo estrual, que se encuentran reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Gómez *et al.*, 2014).

Al continuo crecimiento y regresión (atresia) de folículos dominantes antrales durante el ciclo estrual, que conduce al desarrollo y ovulación de un folículo dominante, se le denomina dinámica folicular (Kastelic y Ginther, 1991). En un ciclo estrual normal bovino,

el desarrollo folicular se caracteriza por la presencia de dos o tres ondas foliculares (Gigli *et al.*, 2006). En cada onda folicular se presentan tres fases: reclutamiento, selección y dominancia folicular (Henaó y Trujillo, 2000).

El reclutamiento es el proceso por el cual una cohorte de folículos antrales pequeños (provenientes del crecimiento lento que tarda de cuatro a seis meses) inician un crecimiento rápido por el estímulo de la oleada de FSH y, cuando alcanza su pico en concentración, los folículos más grandes tienen en promedio un diámetro de 4 mm (Henaó y Trujillo, 2000).

Durante la fase de selección un folículo de la cohorte es seleccionado para continuar su crecimiento y convertirse en dominante (Delgado *et al.*, 2011). En esta etapa el proceso de selección es la divergencia, el cual corresponde al tiempo en que el folículo dominante y el subordinado más desarrollado crecen a tasas diferentes, antes de que el subordinado experimente atresia (Ginther *et al.*, 1997; Henaó y Trujillo, 2003).

La fase de dominancia folicular, que es la etapa en la que se da el desarrollo del folículo, comprende desde la divergencia hasta el momento en que el folículo dominante produce la máxima cantidad de estradiol, antes de experimentar atresia o de ovular (De la Sota *et al.*, 1996; Figueiredo *et al.*, 1997). Durante esta fase, el folículo continúa su crecimiento que lo prepara para la ovulación, bajo un ambiente de concentraciones basales de FSH (Peña *et al.*, 2004); presenta diferencias entre el folículo dominante y los subordinados en cuanto al diámetro folicular, número de células de la granulosa, de receptores de FSH y LH, y la concentración de estradiol en el líquido folicular (Uribe *et al.*, 2008; Maldonado *et al.*, 2016).

### **2.3. Ciclo estrual**

El ciclo estrual es el tiempo que transcurre entre dos estros, y en la hembra bovina varía normalmente entre 17 a 24 días, considerándose 21 días como el tiempo promedio (Góngora y Hernández, 2006). El ciclo estrual está regulado por la interacción del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, mediante la liberación de hormonas hipotalámicas (gonadotropinas) y gonadales (esteroides) (Hafez y Hafez, 2000). El ciclo estrual bovino está comprendido por cuatro períodos: proestro, estro o celo, metaestro y diestro.

### **2.3.1. Proestro**

Inicia con la luteólisis o regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y termina con el inicio del estro o celo; dura de dos o tres días (Brem *et al.*, 2016). El cuerpo lúteo es destruido por la acción de la prostaglandina  $F_2\alpha$  ( $PGF_2\alpha$ ) de origen uterino; mientras que se da la caída de la progesterona, el efecto de retroalimentación negativa que ejercía a nivel hipotalámico desaparece y comienza a aumentar la frecuencia pulsátil de FSH y LH para estimular el crecimiento folicular (Bavera *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2014).

### **2.3.2. Estro o celo**

Es el periodo de actividad y receptividad sexual, en donde el signo principal es que la hembra se quede parada y quieta al ser montada por otra (Wiltbank *et al.*, 2002), aunque también se manifiestan otros signos como inquietud, inflamación de la vulva y secreción de moco claro y transparente por la vulva (Hafez y Hafez, 2000). Estos signos ocurren gracias a la presencia de los estrógenos provenientes del folículo, que al incrementar su concentración inducen la aparición de los signos de celo, donde la duración de éste es muy variable, pero se considera un tiempo promedio de  $16 \pm 4$  h (Lucy, 2006).

Los altos niveles de estrógenos afectan al centro endocrino en el hipotálamo que controla la liberación de GnRH y a su vez la liberación de FSH y LH de la hipófisis. Sin embargo, el incremento de la LH se da después del inicio de los signos del celo e inicia el proceso de ovulación, por lo que se le considera a esta gonadotropina la responsable de la ovulación (Brem *et al.*, 2016; D'Alessandro y Martemucci, 2016).

### **2.3.3. Metaestro**

Desde el comienzo del celo (12 a 24 h antes), el sistema nervioso central de la hembra se vuelve refractario a los estrógenos, desapareciendo los signos del celo, y de inmediato se inicia el metaestro con una duración de 3 a 5 días (Bó *et al.*, 2004). Durante esta fase ocurre la ovulación (entre 28 y 32 h de haberse iniciado el celo) (Lucy, 2006). Después de la ovulación, en el sitio en el que ésta ocurre se produce una hemorragia y el folículo se llena de sangre convirtiéndose en un cuerpo hemorrágico; éste, por efecto de la luteinización de

las células foliculares que se transforman en células luteales, se convierte en cuerpo lúteo, para finalizar con esta fase e iniciar el diestro (Hafez y Hafez, 2000).

#### **2.3.4. Diestro**

Esta fase va del día 5 al 18 del ciclo estrual y se caracteriza por la presencia y dominio de un cuerpo lúteo en el ovario y la producción de progesterona; además, está regulada por las secreciones de la adenohipófisis, útero, ovario y la presencia de un embrión (Díaz, 1999). La LH se considera luteotrópica y la concentración de receptores luteales a la LH está relacionada con los cambios en los niveles de progesterona y el crecimiento del cuerpo lúteo en el ovario (Rippe, 2009).

Los niveles de progesterona más altos se alcanzan en el día 10 del ciclo estrual y se mantienen hasta el día 16 o 18 del ciclo, dependiendo de la presencia o no de un embrión (Bó *et al.*, 2004). Si se logra la gestación, el cuerpo lúteo se mantiene, así como los niveles de progesterona altos, incluso se bloquea la reaparición del celo (Góngora y Hernández, 2006), pero si no existe gestación, el cuerpo lúteo es inducido a regresión por acción de la  $PGF_{2\alpha}$ , dando comienzo a la disminución de los niveles de progesterona y con ello al final de la fase lútea o diestro y al reinicio del proestro (Brem *et al.*, 2016).

#### **2.4. Ovulación múltiple (OM)**

Se denomina OM cuando se incrementa el número fisiológico de ovulaciones propias de la especie mamífera (Bó *et al.*, 2018). El bovino es un mamífero que es monovular, por lo que solamente tiene una cría de manera natural en un periodo reproductivo; sin embargo, cuando la hembra es sometida a un tratamiento hormonal para inducción de OM, se puede obtener más de una ovulación (Waltero y Dias, 2013). El éxito de la OM está influenciado por diversos factores que intervienen en conjunto, tales como raza, edad, historia reproductiva, programa de OM, clima, nutrición, manejo de la donadora, calidad del semen e inseminador (Hasler, 2014).

La OM en bovinos se estableció de manera experimental en la década de 1970, cuando los tratamientos iniciaban en la fase lútea media, es decir, 8 a 12 días después de ser observado el celo en la donadora (Hafez y Hafez, 2000). En esa misma década, estudios realizados

sobre la actividad folicular de las hembras bovinas durante un ciclo estrual demostraron que presentan de dos a tres ondas de desarrollo folicular, por lo tanto, basado en estos hallazgos, los tratamientos de OM se iniciaban el día 9 o 10 después de presentarse el celo (Becaluba, 2007).

En los comienzos de la OM, el principio básico era aplicar una sola dosis de eCG; después se cambió a la aplicación de múltiples dosis de FSH entre los días 8 y 12 después del celo; aunque resultó ser una técnica fiable, no se lograba aumentar el número de embriones recolectados, además de la limitante que representaba la necesidad de conocer la fecha exacta del celo, lo que en consecuencia no permitía tener grupos de donadoras debido a que las hembras presentaban celo en días diferentes (Hasler, 2014).

A través de los años se han desarrollado diferentes protocolos de OM para incrementar el número de embriones por vaca donadora, principalmente con la aplicación de diferentes dosis de FSH y eCG o su conjunto, muchos de los cuales contemplan además la utilización de dispositivos intravaginales liberadores de progesterona que permiten realizar la inducción de OM en cualquier etapa del ciclo estrual (Waltero y Dias, 2013; Tirapelli *et al.*, 2014).

A nivel mundial, el promedio de embriones transferibles por donadora sometida a un programa de OM fue de 6.6 en el 2012 y 6.9 en el 2013 (IETS, 2014). Hasler (2014) menciona que no se ha observado aumento en el promedio de embriones transferibles obtenidos por vaca donadora desde hace 30 años, tanto en bovinos de carne como lecheros. No obstante, a nivel mundial se ha incrementado en 13.5 % la producción *in vivo* de embriones transferibles, pasando de 505 876 a 575 785 embriones en 2013 (IETS, 2014), y alcanzando 632 638 embriones en 2016, con un promedio de 6.7 embriones viables por donadora por OM (IETS, 2017).

Estudios realizados por Yang *et al.* (2010) utilizando un protocolo con dosis decreciente de FSH durante cuatro días, posterior a la inserción del dispositivo intravaginal liberador de progesterona, más el uso de PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , reportaron una producción de 4.35 embriones transferibles por medio de la inducción a OM en vacas Holstein. Salgado *et al.* (2011) realizaron inducción de OM en ganado Brahman utilizando un protocolo con base en dosis decrecientes de FSH, más un dispositivo intravaginal liberador de progesterona, estradiol,

gonadotropina y  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , teniendo como resultado 4.4 embriones transferibles y solo 3.7 congelables.

Un estudio relacionado con la variación genética del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R) y la inducción a OM en donadoras Luxi y Holstein, aplicaron un protocolo de ocho inyecciones de FSH por cuatro días en dosis decreciente, esto al cuarto días posterior a la inserción de un dispositivo liberador de progesterona, además, se usó  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ; los resultados mostraron un promedio de 4.5 y 3.7 embriones transferibles para los genotipos g404GG y g404GT, respectivamente; con esto demostraron que el polimorfismo en el IGF1R en el ganado se asocia a rasgos de la OM, indicando que se puede utilizar como marcador para la selección de donadoras (Yang *et al.*, 2013); sin embargo, estos resultados son inferiores a lo reportado por la IETS (2015).

Biancucci *et al.* (2016), realizaron una comparación de dos protocolos (liberación lenta y tradicional de ocho aplicaciones) de OM en donadoras de la raza Marchigiana; el tratamiento consistió en sincronizar la ovulación para posteriormente iniciar con los tratamientos de inducción a OM el día 8 y 11 del ciclo estral con Pluset® (que contiene FSH/LH); para el grupo control se le asignó un tratamiento con 8 aplicaciones de forma decreciente y el grupo de liberación lenta se administró dos veces con diferencia de 48 h. Los resultados obtenidos fueron de 6.6 y 9.6 embriones viables para el grupo control y liberación lenta, respectivamente. La mayor cantidad de embriones viable del tratamiento de liberación lenta se puede atribuir a las concentraciones sostenidas de pFSH en circulación y a la actividad reducida del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, como resultado del menor número de inyecciones a la donante.

En estudio retrospectivo de programas de OM realizados durante 10 años en ganado Holstein, Mikkola y Taponen (2017) indicaron que los dos productos comerciales más utilizados para los tratamientos de OM en vacas y novillonas (Folltropin® que solo contiene FSH y Pluset®) no mostraron diferencias en el número de embriones viables por hembra donadora, teniendo promedios de 6.9 y 7.1 para novillas y vacas tratadas con Folltropin®, y 6.7 y 7.8 para las tratadas con Pluset®, concluyendo que la dosis y los productos utilizados para la OM no muestran diferencias, por lo cual son comparables desde el punto de vista práctico.

### 2.4.1. Protocolos hormonales para inducción de ovulación múltiple

Los primeros protocolos utilizados para la inducción de OM en el ganado bovino incluían la administración de gonadotropinas por varios días antes de la presentación del estro normal, debido al desconocimiento que se tenía sobre las ondas foliculares (Byrn, 2010); además, se incluía una dosis de gonadotropina coriónica humana (hCG) 5 días después, debido a que esta hormona actúa como LH induciendo la ovulación de los folículos preovulatorios (Bó y Mapletoft, 2014). Por otro lado, se empezó a utilizar la eCG, y se observó que el momento adecuado para su aplicación era durante la transición de la fase lútea a la folicular, en el día 16 del ciclo estrual, particularmente en hembras que experimentaban luteólisis natural (Bó y Mapletoft, 2014).

Uno de los protocolos de OM ampliamente utilizado en la década de 1970 contemplaba suministrar 2000 a 3000 UI de eCG en el día 16 del ciclo estrual (para inducir el desarrollo folicular), el día 19 y 20 aplicar 10 mg de 17 $\beta$ -estradiol (para garantizar la regresión lútea), y el día 21 administrar 2000 UI de hCG (para inducir la ovulación); sin embargo, observaron que con el uso del estradiol la mayoría de las donadoras mostraron estro (Gordon, 1975; Bó y Mapletoft, 2014).

Elsden *et al.* (1978) demostraron que se obtenía mayor respuesta de OM después del tratamiento con extracto de hipófisis que contenía FSH más 20 % de LH en comparación con el uso de eCG; de igual forma, se reportó mayor tasa de ovulación y de donadoras que producían más de tres embriones transferibles con el uso de FSH en lugar de eCG (Monniaux *et al.*, 1983); sin embargo, otros estudios no encontraron diferencia por usar FSH o eCG (Mapletoft *et al.*, 1986; Goulding *et al.*, 1996).

Se demostró que donadoras tratadas con eCG tenían perfiles anormales de LH y progesterona, lo que se relacionaba con una reducción en la ovulación y la tasa de fertilidad (Greve *et al.*, 1983). Además, la razón para cambiar la eCG por la FSH se debió principalmente a la estimulación prolongada de los ovarios después de una sola inyección de eCG, a causa de la vida media de 40 h de esta hormona en la hembra bovina, causando una estimulación ovárica continua, folículos no ovulados, perfiles endocrinos anormales y una reducción en la calidad de los embriones (Murphy y Martinuk, 1991; Dieleman *et al.*, 1993; Mapletoft y Bó, 2011; Bó y Mapletoft, 2014).



A partir de 1990, se realizaron investigaciones sobre la capacidad de inducir la aparición de ondas foliculares mediante el uso de progestágenos y estradiol (Bo *et al.*, 1995), lo que permitió iniciar la OM sin importar el período del ciclo estrual y sin la detección del estro (Mapletoft *et al.*, 2002). El tratamiento consta de la administración de 2.5 a 5 mg de 17 $\beta$ -estradiol o 2 a 2.5 mg de benzoato de estradiol (para suprimir la liberación de FSH e inducir la atresia folicular), más 100 o 50 mg de progesterona intramuscular junto con la inserción de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona que simula la presencia de un cuerpo lúteo funcional (Mapletoft *et al.*, 2002), esto realizándose en cualquier día del ciclo estrual, sin importar la fase del mismo, considerándose a este día el Día 0 (Bó *et al.*, 2002; Baruselli *et al.*, 2006).

El Día 4 se inicia la aplicación de FSH (para el desarrollo de más de un folículo) cada 12 h por cuatro días consecutivos, para aprovechar la nueva onda folicular que surge por la destrucción de cualquier folículo dominante presente en los ovarios después de la aplicación del benzoato de estradiol el Día 0 (Bó y Mapletoft, 2014). Posteriormente, el Día 6 se aplica PGF $_{2\alpha}$  para lisar el cuerpo lúteo (García *et al.*, 2012). El Día 7 se retira el dispositivo intravaginal, dando como resultado la caída de la concentración de progesterona en sangre, pudiéndose aplicar el mismo día eCG (que cumple la función de la FSH y LH), con la finalidad de que varios folículos lleguen a ser dominantes (Small *et al.*, 2009).

El Día 8 se aplica GnRH para estimular la liberación de gonadotropinas y para que en consecuencia se dé la ovulación (12-18 h después) de todos los folículos dominantes presentes (Deyo *et al.*, 2001), que podrán ser fertilizados al hacerse la inseminación artificial. Los embriones se recolectan el Día 15 del programa de inducción a OM.

## **2.5. Criopreservación de embriones**

La congelación de células vivas, como los embriones bovinos, se realiza bajo un proceso fisicoquímico complejo, mediante el transporte de calor y agua entre la célula y el medio que la rodea (Mazur, 1984; Arav, 2014; Gupta *et al.*, 2016). Este proceso se basa en remover al máximo el agua intracelular antes del inicio del descenso de temperatura por debajo de 0 °C, para evitar la formación de cristales de hielo que dañen a las células y para tener mayor

posibilidad de reanudar el metabolismo celular después del almacenamiento a bajas temperaturas (Vajta y Kuwayama, 2006).

Durante el proceso de criopreservación la temperatura disminuye y el agua del medio se cristaliza, llevando al aumento de la concentración de solutos extracelulares; en ese momento, la velocidad de congelación se disminuye para promover la deshidratación adecuada de la célula, ya que si este proceso se hace de manera rápida, la célula no podría perder agua suficiente, lo que resultaría en la formación de cristales de hielo que causarían daños a las células, e inclusive su muerte (Mazur, 1984; Ávila *et al.*, 2016; Mazur y Paredes, 2016).

Para evitar los daños que puede causar el congelamiento del agua intracelular, se utilizan crioprotectores que protegen a las células en el momento de la criopreservación con la finalidad de disminuir la formación de cristales de hielo (Diez *et al.*, 2012; Mazur y Paredes, 2016). Existen tres tipos de criopreservadores: alcoholes (etilenglicol, 1-2 propanodiol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa) y el dimetil sulfóxido; también se pueden clasificar en permeables y no permeables (Ávila *et al.*, 2016).

Los crioprotectores permeables (alcoholes y dimetil sulfóxido) tienen un peso molecular bajo y son capaces de atravesar la membrana celular de forma activa; de éstos, el etilenglicol es el más utilizado para criopreservar embriones bovinos, debido a su baja toxicidad para las células y rápida difusión a través de la membrana plasmática (Albarracín y Mogas, 2005; Ávila *et al.*, 2016). Los crioprotectores no permeables no son capaces de atravesar la membrana plasmática debido a su elevado peso molecular y no presentan efectos crioprotectores por sí solos; su función es elevar la presión osmótica y disminuir la cantidad requerida de crioprotectores permeables y por tanto su toxicidad, favoreciendo así la deshidratación celular (Liebermann *et al.*, 2002; Vajta y Kuwayama, 2006). El crioprotector no permeable más utilizado en la congelación de embriones es la sacarosa (Diez *et al.*, 2012). Para que los crioprotectores no permeables funcionen de forma adecuada deben ser mezclados con crioprotectores permeables (Mazur y Paredes, 2016).

Al conservar los embriones en nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  se detienen por completo las actividades enzimáticas intracelulares, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc. (Rall, 1992; Yurchuk *et al.*, 2018), y se reducen de manera acelerada las

actividades fisiológicas de la célula, lo que permite almacenar los embriones durante largo tiempo sin afectar su viabilidad (Celestinos y Gatica, 2002).

La tasa de supervivencia de los embriones congelados es uno de los parámetros de mayor importancia porque permite evaluar su viabilidad (dos Santos Neto *et al.*, 2015). Existe evidencia de que los embriones con mayor desarrollo son más tolerantes a los procesos de criopreservación, lo que los hace tener una mayor probabilidad de sobrevivir después de su transferencia, en comparación a sus homólogos de menor desarrollo, cuya viabilidad es menor (Carrocera *et al.*, 2015).

La criopreservación tiene ventajas durante la ejecución de un programa de TE porque permite disponer de vacas receptoras en condiciones óptimas, programar los empadres y partos y facilitar el traslado del material genético para el comercio internacional y nacional (Roa *et al.*, 2010). Otra ventaja es que permite disponer de hembras donadoras y receptoras en diferentes tiempos, así como conservar embriones en bancos de germoplasma (Cabodevila y Teruel, 2001).

Recientemente se utilizan dos métodos para criopreservar embriones bovinos, mismos que son la congelación lenta (CL) y la vitrificación (VT); no obstante, la CL ha sido sustituida gradualmente por la VT, con el propósito de evitar los efectos de daño por el frío y la formación de cristales de hielo que suceden comúnmente en la CL, para evitar el daño de la membrana y orgánulos celulares (de Oliveira Leme *et al.*, 2015). Aunque cualquier método de criopreservación puede causar daños en el perfil molecular de cualquier embrión mamífero, se ha demostrado que la VT puede disminuir los daños que se presentan cuando se usa CL (Celestinos y Gatica, 2002).

Con respecto a la TG con embriones producidos *in vivo* y criopreservados por VT y CL, los resultados son muy variables. Una investigación realizada en el trópico mexicano obtuvo una TG del 11 y 27 % en receptoras cruzas de *Bos taurus* x *Bos indicus* a las cuales se les transfirieron embriones producidos *in vivo* y criopreservados por CL y VT respectivamente. Estos resultados fueron inferiores a lo reportado por otros autores y se debió principalmente al manejo implementado a las receptoras, ya que estaban lactando y su condición corporal no fue la adecuada para incluirlas en un programa de TE (Naranjo *et al.*, 2016).

### **2.5.1. Congelación lenta (CL)**

Cada célula tiene un ritmo óptimo de enfriamiento. Para este método se utiliza suero fetal bovino (FBS) o albúmina de suero de bovino (BSA), añadiéndose rutinariamente al medio de congelación y de manipulación de los embriones, para la protección de la membrana celular durante la congelación, así como alcoholes para una mejor protección de la célula al momento de la criopreservación (Isobe *et al.*, 2013).

Para el proceso de criopreservación por CL, se expone los embriones a una solución de equilibrio a 1.5 Mol de etilenglicol como crioprotector a temperatura ambiente (25-35 °C), permitiendo que el agua intracelular fluya hacia el exterior y se congele fuera de la célula debido a la deshidratación (Michelmann y Nayudu, 2006). El tiempo de equilibrio que permite al embrión una deshidratación adecuada es de 15 a 20 minutos; posteriormente, los embriones son envasado en pajillas plásticas de 0.25 ml (Niemann, 1991; Larocca *et al.*, 1998). Este método utiliza un equipo de congelación, donde se coloca la pajilla dentro de la crio-cámara a una temperatura de -6 °C; posteriormente se induce la cristalización o seeding 5 a 7 minutos después de introducir la pajilla, tocando el extremo superior de ésta con una pinza metálica enfriada en nitrógeno líquido (Michelmann y Nayudu, 2006). Luego, la congeladora automáticamente desciende la temperatura a una velocidad de 0.3 y 0.5 °C por minuto hasta llegar a -32 °C, momento en el cual las pajillas son sumergidas en nitrógeno líquido para su almacenamiento (Celestinos y Gatica, 2002).

### **2.5.2. Vitricación (VT)**

El método de VT se considera una congelación ultrarrápida (25,000 °C/min). Además de ser sencilla de realizar, con este método se inducen cambios intracelulares para evitar la formación de cristales de hielo, debido a la alta concentración de crioprotectores y a la velocidad de congelación, para que al momento de que los embriones sean calentados (o reanimados) para su transferencia, se les cause el menor daño por frío (An *et al.*, 2015). En la VT se utilizan crioprotectores en alta concentración, que al ser congelados hacen que la solución se torne viscosa y pase del estado líquido a un estado sólido similar al vidrio, con lo que se evita la formación de cristales de hielo; el procedimiento no requiere más de 15 minutos y no requiere un equipo sofisticado ni caro (Ruiz *et al.*, 2010).

Para la VT, el medio debe tener una alta concentración de crioprotectores de 5 ó 6 mol, en comparación con la concentración utilizada para la CL; además, se requiere de un descenso de temperatura de manera ultrarrápida, para evitar la formación de cristales de hielo (Arav, 2014). Todos los sistemas de VT exponen a los embriones primero a una solución de mantenimiento, después a una de equilibrio y finalmente a la de vitrificación. En estas soluciones, la concentración de los crioprotectores aumenta entre una y otra, con la finalidad que el embrión se adapte a dichos medios de forma progresiva. Por otro lado, en la etapa de la reanimación de los embriones se incorporan carbohidratos y de igual forma, las concentraciones son diferentes hasta que se reestablezcan la forma habitual del embrión (Martino *et al.*, 1996).

La solución de VT más empleada contiene un crioprotector permeable (etilenglicol) y uno no permeable (sacarosa) que se mantiene extracelular; en esta solución el tiempo de equilibrio es de 20 a 30 s, y transcurre a temperatura ambiente. Posteriormente, los embriones son cargados en el dispositivo de VT y almacenamiento, mismo que se sumerge en nitrógeno líquido, a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Vajta y Kuwayama, 2006). Es necesario que el volumen de la solución de VT del dispositivo en el que quedarán contenidos los embriones sea lo más pequeño posible, para que la velocidad de vitrificación sea lo suficientemente rápida al ser sumergido en nitrógeno líquido, de manera que el agua no tenga tiempo para formar cristales y provocar daños intracelulares, lo que potencializa su supervivencia (Bianchi *et al.*, 2005).

## **2.6. Transferencia de embriones (TE)**

La TE es una técnica eficiente que permite el mejoramiento genético de los hatos ganaderos, al tener un mayor número de descendientes de hembras y machos de alto valor genético (Martínez y Valcárcel, 2008; Hasler, 2014). La descendencia que se puede lograr con una donadora dentro de los programas de TE es en promedio de 10 a 15 crías por año (Hafez y Hafez, 2000). Además, permite acortar el intervalo generacional debido a la mejora genética dentro de las unidades de producción, lo que se logra a través de transferir embriones de donadoras de mayor producción a receptoras con menor producción y valor genético (Hasler, 2014).

Los embriones bovinos que se utilizan para los programas de TE pueden ser producidos *in vivo*, y en tal caso se considera desde la selección de hembras donadoras hasta la transferencia en hembras receptoras. Las etapas son: la inducción de la OM (donadora), la recolección de los embriones vía transcervical (Hafez y Hafez, 2000), la clasificación de los embriones según las especificaciones de la Sociedad Internacional de Tecnologías Embrionarias (IETS, por sus siglas en inglés) para su transferencia en fresco o su criopreservación; la sincronización del celo (receptoras) mediante protocolos de sincronización de la ovulación, para realizar la transferencia a tiempo fijo del embrión (fresco o criopreservado), y por último el diagnóstico de la gestación 45 días posterior a la transferencia (IETS, 2014).

La IETS reportó que en el 2014 se transfirieron 464 582 embriones bovinos a nivel mundial, teniendo una pequeña disminución en el número de transferencias realizadas en comparación con el año anterior (2013; 485 595), debido a que un país no proporcionó los datos sobre sus transferencias en el año, (IETS, 2015). En 2016, la IETS reportó la transferencia de 516 585 embriones, de los cuales 321 022 fueron congelados y 195 563 fueron en fresco (IETS, 2017).

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### **Hipótesis 1**

Se obtiene similar respuesta a la ovulación múltiple con FSH y eCG en donadoras *Bos taurus* x *Bos indicus* de edad media y madura bajo condiciones de trópico húmedo.

#### **Objetivo general**

Evaluar la producción de embriones en donadoras *Bos taurus* x *Bos indicus* de edad media y madura inducidas a ovulación múltiple bajo condiciones de trópico húmedo.

#### **Objetivos específicos**

Evaluar el número total de cuerpos lúteos, total de estructuras recolectadas incluyendo embriones viables, embriones degenerados y ovocitos infertilizados, en donadoras bovinas de edad media y madura inducidas a ovulación múltiple con FSH y eCG.

Comparar la respuesta de donadoras bovinas de edad media y maduras inducidas a ovulación múltiple con FSH y eCG.

#### **Hipótesis 2**

El uso de una dosis baja de hormona folículo estimulante en combinación con una dosis alta de gonadotropina coriónica equina en protocolos de inducción de ovulación múltiple en donadoras *Bos taurus* x *Bos indicus* incrementa el número de embriones viables.

#### **Objetivo general**

Evaluar la producción de embriones en donadoras *Bos taurus* x *Bos indicus* después de la inducción de ovulación múltiple con un número reducido de aplicaciones de hormona folículo estimulante y una dosis alta de gonadotropina coriónica equina.

### **Objetivos específicos**

Evaluar la respuesta de donadoras bovinas inducidas a ovulación múltiple con un protocolo utilizando 350 UI de Folltropin® (FSH) y 600 UI de eCG.

Evaluar la respuesta de donadoras bovinas inducidas a ovulación múltiple con un protocolo utilizando 500 UI de Pluset® (FSH/LH) y 600 UI de eCG.

Evaluar la respuesta de donadoras bovinas inducidas a ovulación múltiple con un protocolo utilizando 455 UI de Folltropin® (FSH) y 400 UI de eCG.

Comparar la respuesta de los tres protocolos de ovulación múltiple.

### **Hipótesis 3**

Se obtiene mayor tasa de gestación después de la transferencia de embriones bovinos producidos *in vivo* criopreservados por vitrificación que por congelación lenta.

### **Objetivo general**

Determinar la tasa de gestación con embriones producidos *in vivo* criopreservados por vitrificación y congelación lenta.

### **Objetivos específicos**

Determinar la tasa de gestación de receptoras bovinas transferidas con embriones producidos *in vivo* y criopreservados por vitrificación.

Determinar la tasa de gestación de receptoras bovinas transferidas con embriones producidos *in vivo* criopreservados por congelación lenta.

Comparar la tasa de gestación de ambos métodos de criopreservación.



#### 4. BIBLIOGRAFÍA

- Albarracín, M. & Mogas, A. (2005). Vitricación de ovocitos bovinos mediante la técnica Open Pulled Straw: Universitat Autònoma de Barcelona.
- An, L., Chang, S., Hu, Y., Li, Y., Xu, B., Zhang, F., . . . Du, F. (2015). Efficient cryopreservation of mouse embryos by modified droplet vitrification (MDV). *Cryobiology*, 71(1), 70-76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.05.067>
- Andújar, P., Fernández, R., Bernabeu, I. & Casanueva, F. (2012). Patología del eje hipotálamo-hipofisario. Tumores pineales. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(13), 751-756. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412\(12\)70378-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412(12)70378-5)
- Arav, A. (2014). Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, 81(1), 96-102. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.011>
- Arce, V., Catalina, P. & Mallo, F. (2006). *Endocrinología: Univ Santiago de Compostela*.
- Armstrong, D., Irvine, B., Earl, C., McLean, D. & Seamark, R. (1994). Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology*, 42(7), 1227-1236. doi: 10.1016/0093-691X(94)90871-0
- Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., . . . Reguero, M. (2016). Fundamentos de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 57(4), 291-300.
- Baruselli, P., de Sá Filho, M., Martins, C., Nasser, L., Nogueira, M., Barros, C., & Bó, G. (2006). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65(1), 77-88. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.006>
- Bavera, G., Bocco, O., Héctor, B. & Petryna, A. (2005). Cursos de producción bovina de carne. FAV UNRC, 2-8.
- Becaluba, F. (2007). Factores que afectan la superovulación en bovinos. Sitio en [Internet]. Disponible en [[http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embriionario/17-superovulacion.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/17-superovulacion.pdf)]. [fecha de acceso 20/03/19].
- Beg, M. & Ginther, O. (2006). Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*, 132(3), 365-377.
- Biagetti, B., Vinagre, I. & Webb, S. (2008). Enfermedades de la neurohipófisis. Tumores pineales. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(13), 849-857. doi: [https://doi.org/10.1016/S0211-3449\(08\)73167-9](https://doi.org/10.1016/S0211-3449(08)73167-9)
- Biancucci, A., Sbaragli, T., Comin, A., Sylla, L., Monaci, M., Peric, T. & Stradaoli, G. (2016). Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol? *Theriogenology*, 85(5), 914-921. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.041>
- Bianchi, V., Coticchio, G., Fava, L., Flamigni, C. & Borini, A. (2005). Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *Human Reproduction*, 20(4), 1078-1083.
- Bo, G., Adams, G., Pierson, R. & Mapletoft, R. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43(1), 31-40. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00010-R](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00010-R)

- Bó, G., Baruselli, P., Chesta, P. & Martins, C. (2006). The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, 65(1), 89-101. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.008>
- Bó, G., Baruselli, P., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., . . . Mapletoft, R. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57(1), 53-72. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00657-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00657-4)
- Bó, G. & Mapletoft, R. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81(1), 38-48. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>
- Bó, G., Moreno, D., Cutaia, L., Baruselli, P. & Reis, E. (2004). Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32(Suplemento 1), 1-22.
- Bó, G., Rogan, D. & Mapletoft, R. (2018). Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. *Theriogenology*, 112, 26-33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.034>
- Boonthum, C., Namdee, K., Boonrungsiman, S., Chatdarong, K., Saengkrit, N., Sajomsang, W., . . . Yata, T. (2017). Chitosan-based DNA delivery vector targeted to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Carbohydrate Polymers*, 157, 311-320. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.015>
- Brem, J., Mestre, J., Pochon, D. & Trulls, H. (2016). Alteraciones del ciclo estral provocadas por un alto ingreso de molibdeno en vaquillonas Brangus y respuesta a la suplementación con cobre. *Revista Veterinaria*, 12(1 y 2), 28-33.
- Bryan, M., Bó, G., Mapletoft, R. & Emslie, F. (2013). The use of equine chorionic gonadotropin in the treatment of anestrus dairy cows in gonadotropin-releasing hormone/progesterone protocols of 6 or 7 days. *Journal of dairy science*, 96(1), 122-131. doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5452>
- Byrn, F. (2010). Use of hCG in Reproductive Dysfunction. *Human Chorionic Gonadotropin (hCG)*, 175.
- Cabodevila, J. & Teruel, M. (2001). Criopreservación de embriones bovinos. *Biotecnología de la Reproducción*, 149-174.
- Carrocera, S., Caamaño, J., Trigal, B., Martín, D. & Díez, C. (2015). Developmental kinetics of in vitro-produced bovine embryos: An aid for making decisions. *Theriogenology*, 85 (5), 822-827. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.028>
- Carvalho, P., Hackbart, K., Bender, R., Baez, G., Dresch, A., Guenther, J., . . . Fricke, P. (2014). Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: A preliminary study. *Theriogenology*, 82(3), 481-489. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.011>
- Celestinos, M., & Gatica, R. (2002). Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Archivos de medicina veterinaria*, 34(2), 157-165.
- Chase, C., Vargas, C., Hammond, A., Olson, T., Griffin, J., Murphy, C., . . . Fields, M. (2009). Embryo transfer in angus and brahman recipient cows: Effect of two methods of estrus synchronization on induced estrus and pregnancy. *Revista científica*, 19(6), 630-638.

- Chen, C., Chiang, Y., Yang, P., Chen, M., Chang, C., Yang, Y. & Chen, S. (2016). Frequency of low serum LH is associated with increased early pregnancy loss in IVF/ICSI cycles. *Reproductive BioMedicine Online*, 33(4), 449-457. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.07.001>
- D'Alessandro, A. G. & Martemucci, G. (2016). Superovulatory response to gonadotrophin FSH/LH treatment and effect of progestin supplement to recipients on survival of transferred vitrified embryos in goats. *Theriogenology*, 85(2), 296-301. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.038>
- De la Sota, R., Simmen, F., Diaz, T., & Thatcher, W. (1996). Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biology of reproduction*, 55(4), 803-812.
- de Oliveira Leme, L., Dufort, I., Spricigo, J., Braga, T., Sirard, M., Franco, M. & Dode, M. (2015). Effect of vitrification using the Cryotop method on the gene expression profile of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 85 (4), 724-733. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.016>
- Delgado, P., Cuéllar, N., Sánchez, C. & Rojas, E. C. C. (2011). Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *vet. zootec*, 5(2), 88-99.
- Deyo, C., Colazo, M., Martinez, M. & Mapletoft, R. (2001). The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave emergence for superstimulation in cattle. *Theriogenology*, 55, 513.
- Díaz, T. (1999). Dinámica del desarrollo folicular ovárico durante el ciclo estral en el bovino. *Rev. Fac. Cien. Vet. UCV*, 40, 3-18.
- Dieleman, S. J., Bevers, M., Vos, P. & De Loos, F. (1993). PMSG/anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment? *Theriogenology*, 39(1), 25-41. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90022-W](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90022-W)
- Diez, C., Munoz, M., Caamaño, J. & Gomez, E. (2012). Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. *Reproduction in domestic animals*, 47(s3), 76-83. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02029.x>
- Do, V. H., Catt, S., Amaya, G., Batsiokis, M., Walton, S. & Taylor-Robinson, A. W. (2018). Comparison of pregnancy in cattle when non-vitrified and vitrified in vitro-derived embryos are transferred into recipients. *Theriogenology*, 120, 105-110. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.07.027>
- dos Santos Neto, P., Vilariño, M., Barrera, N., Cuadro, F., Crispo, M. & Menchaca, A. (2015). Cryotolerance of Day 2 or Day 6 in vitro produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods. *Cryobiology*, 70(1), 17-22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.11.001>
- Echeverría, J. (2006). Endocrinología reproductiva: prostaglandina F2 $\alpha$  en vacas. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 2(01).
- Elsden, R. P., Nelson, L. D. & Seidel, G. E. (1978). Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*, 9(1), 17-26. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(78\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(78)90049-3)
- Fernández, R., Bernabeu, I. & Casanueva, F. (2012). Enfermedades de la neurohipófisis. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(13), 782-787. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(12\)70382-7](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(12)70382-7)
- Figueiredo, R., Barros, C., Pinheiro, O. & Soler, J. (1997). Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, 47(8), 1489-1505. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00156-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00156-8)

- Fink, G. (2015). 60 years of neuroendocrinology: memoir: Harris' neuroendocrine revolution: of portal vessels and self-priming. *Journal of Endocrinology*, 226(2), T13-T24.
- Forde, N., Beltman, M., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. & Crowe, M. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal reproduction science*, 124(3-4), 163-169. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.025>
- Franco, J. & Uribe, V. (2012). Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas rumiantes. *Biosalud*, 11(1), 41-56.
- Garcia, A., Tribulo, A., Yapura, J., Singh, J. & Mapletoft, R. (2012). Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology*, 78 (2), 353-360. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.010>
- Gigli, I., Russo, A. & Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*, 8(1), 183-204.
- Ginther, O., Kot, K., Kulick, L. & Wiltbank, M. (1997). Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, 48(1), 75-87. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00192-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00192-1)
- Gogce, M., Benchaib, M., Hadj, S., Bordes, A., du Menildot, P., Lornage, J. & Salle, B. (2015). Administration d'agonistes de la GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone) en phase lutéale des protocoles substitutifs de transferts d'embryons congelés: étude prospective randomisée. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 43(11), 728-734.
- Gómez, T., Aguilera, R. & Galicia, C. (2014). Las orexinas dos péptidos hipotalámicos: Su localización y acción en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. The two hypothalamic orexin peptides: Their location and action on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis., 15(6), 345-350.
- Góngora, A. & Hernández, A. (2006). Comportamiento sexual, duración del estro y del ciclo estral en novillas criollas sanmartineras y brahman del piedemonte llanero colombiano. *Livestock Research for Rural Development*, 18(1).
- Gordon, I. (1975). Problems and prospects in cattle egg transfer. *Irish Veterinary Journal (Ireland)*.
- Goulding, D., Williams, D., Roche, J. & Boland, M. (1996). Factors affecting superovulation in heifers treated with PMSG. *Theriogenology*, 45(4), 765-773. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00006-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00006-4)
- Greve, T., Callesen, H. & Hyttel, P. (1983). Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nordisk veterinærmedicin*, 35(11), 408-421.
- Gupta, A., Singh, J. & Anzar, M. (2016). Effect of cryopreservation technique and season on the survival of in vitro produced cattle embryos. *Animal reproduction science*, 164, 162-168. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.026>
- Hafez, E. S. E. & Hafez, B. (2000). Reproducción e Inseminación Artificial en animales (M.-H. I. Editores Ed. Cuarta edición ed.).
- Hasler, J. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81(1), 152-169. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>
- Henao, G. & Trujillo, L. E. (2000). Establecimiento y desarrollo de la dominancia folicular bovina. Revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 13(2), 108-120.

- Henao, G. & Trujillo, L. E. (2003). Dinámica folicular y función lútea durante la gestación temprana. Estudio de un caso en *Bos indicus*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 56(1), 1779-1788.
- Henao, G., Trujillo, L. E. & Maldonado, J. (2016). Liberación de gonadotropinas hipofisarias y factores que la afectan durante el posparto bovino. Revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 13(1), 46-57.
- Hu, K., Chang, H. M., Li, R., Yu, Y. & Qiao, J. (2019). Regulation of LH secretion by RFRP-3 – From the hypothalamus to the pituitary. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 52, 12-21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.03.005>
- Huang, Y., Jin, H., Chen, J., Jiang, X., Li, P., Ren, Y., . . . Smith, G. W. (2015). Effect of Vitamin D on basal and Luteinizing Hormone (LH) induced testosterone production and mitochondrial dehydrogenase activity in cultured Leydig cells from immature and mature rams. *Animal reproduction science*, 158, 109-114. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.008>
- IETS. (2014). 2013 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals.
- IETS. (2015). 2014 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals.
- IETS. (2017). 2016 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals.
- Isobe, T., Ikebata, Y., Onitsuka, T., Do, L. T. K., Sato, Y., Taniguchi, M. & Otoi, T. (2013). Cryopreservation for bovine embryos in serum-free freezing medium containing silk protein sericin. *Cryobiology*, 67(2), 184-187. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.06.010>
- Jackson, A. L., Breen, S. M., Rodriguez-Zas, S. L. & Knox, R. V. (2006). Evaluation of methodology for administration of porcine FSH for use in estrus induction and for increasing ovulation rate in prepubertal gilts. *Theriogenology*, 66(4), 1042-1047. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.045>
- Jadhao, A. G., Pinelli, C., D'Aniello, B. & Tsutsui, K. (2017). Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in the amphibian brain and its relationship with the gonadotropin releasing hormone (GnRH) system: An overview. *General and Comparative Endocrinology*, 240, 69-76. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.09.006>
- Jin, J. M. & Yang, W. X. (2014). Molecular regulation of hypothalamus–pituitary–gonads axis in males. *Gene*, 551(1), 15-25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.048>
- Kaiser, U. B., Conn, P. M. & Chin, W. W. (1997). Studies of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Action Using GnRH Receptor-Expressing Pituitary Cell Lines 1. *Endocrine Reviews*, 18(1), 46-70.
- Kaprara, A. & Huhtaniemi, I. T. (2018). The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism*, 86, 3-17. doi: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.018>
- Kastelic, J. & Ginther, O. (1991). Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Animal reproduction science*, 26(1), 13-24. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(91\)90062-5](https://doi.org/10.1016/0378-4320(91)90062-5)
- Kim, B., Kang, E. S., Fava, M., Mischoulon, D., Soskin, D., Yu, B.-H., . . . Jeon, H. J. (2013). Follicle-stimulating hormone (FSH), current suicidal ideation and attempt in female patients with major depressive disorder. *Psychiatry Research*, 210(3), 951-956. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2013.08.057>

- Kobayashi, T., Pakarinen, P., Torgersen, J., Huhtaniemi, I. & Andersen, Ø. (2008). The gonadotropin receptors FSH-R and LH-R of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)—2. Differential follicle expression and asynchronous oogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, 156(3), 595-602. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.02.010>
- Larocca, C., Fila, D., Kmaid, S., Fernández, A., Lago, I. & Roses, G. (1998). Viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro congelados-descongelados en dos medios de cultivo con  $\beta$ -mercaptoetanol. *Arch. Zootec*, 47, 3-10.
- Ledezma, R., Camacho, M., Picón, F., Moreno, G. & Zárate, J. (2011). Efecto del CIDR aplicado en vacas de carne receptoras para transferencia de embriones sobre la tasa de preñez. *CiENCiAUANL*, 14(3), 281-287.
- Legan, S., Peng, X., Yun, C. & Duncan, M. (2015). Effect of arousing stimuli on circulating corticosterone and the circadian rhythms of luteinizing hormone (LH) surges and locomotor activity in estradiol-treated ovariectomized (ovx+ EB) Syrian hamsters. *Hormones and behavior*, 72, 28-38.
- Liebermann, J., Nawroth, F., Isachenko, V., Isachenko, E., Rahimi, G. & Tucker, M. J. (2002). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology of reproduction*, 67(6), 1671-1680.
- Lucy, M. (2006). Estrus: basic biology and improving estrous detection. Paper presented at the Proc. Dairy Cattle Reproductive Conference.
- Luna, P., Ramírez, G., Rodríguez, A. & Gutiérrez, A. (2014). Duración del ciclo estral y dinámica ovárica en vaquillas de doble propósito tratadas con oxitocina en el trópico. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 23(1).
- Maldonado, J., Agudelo, B. & Vásquez, A. (2016). Dinámica folicular en novillas y vacas *Bos indicus* y *Bos taurus*. *Revisión de literatura. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 10(2), 67-75.
- Mapletoft, R. & Bó, G. (2011). The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 278-283. doi: <https://doi.org/10.1071/RD11919>
- Mapletoft, R. & Bó, G. (2012). The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 278-283. doi: 10.1071/RD11919
- Mapletoft, R., Lindsell, C. & Pawlyshyn, V. (1986). Effects of clenbuterol, body condition and non-surgical embryo transfer equipment on pregnancy rates in bovine recipients. *Theriogenology*, 25(1), 172. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90226-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90226-8)
- Mapletoft, R., Steward, K. & Adams, G. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 42(6), 601-611.
- Marín, G. P., Alcántara, A. F., Mejía, C. M., Cerón, J. H. & Padilla, E. G. (2004). Purificación de cinco isoformas de la hormona luteinizante bovina (bLH). Caracterización fisicoquímica, biológica e inmunológica Purification of five bovine luteinizing hormone (bLH) isoforms. Chemical, physical, biological and immunological characterization. *Vet. Méx*, 35, 2.
- Martínez, A. G. & Valcárcel, A. (2008). Vitrificación de embriones bovinos obtenidos. *Reproducción*, 23, 21-33.
- Martino, A., Songsasen, N. & Leibo, S. (1996). Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of reproduction*, 54(5), 1059-1069.

- Mateos, J., Mañanos, E., Carrillo, M. & Zanuy, S. (2002). Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132(1), 75-86. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00535-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00535-8)
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*, 247(3), C125-C142.
- Mazur, P. & Paredes, E. (2016). Roles of intracellular ice formation, vitrification of cell water, and recrystallisation of intracellular ice on the survival of mouse embryos and oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(8), 1088-1091.
- Mellisho, S., Ordoñez, I., Alvarado, E. & Flores, E. (2007). Comparación de la gonadotropina coriónica equina (eCG) convencional versus un producto comercial en la sincronización del estro en ovejas. *Anal. Cient. UNALM*, 68(1), 100-106.
- Michelmann, H. & Nayudu, P. (2006). Cryopreservation of human embryos. *Cell and tissue banking*, 7(2), 135-141.
- Mikkola, M. & Taponen, J. (2017). Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. *Theriogenology*, 88, 84-88. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.052>
- Miller, W. L., Shafiee-Kermani, F., Strahl, B. D. & Huang, H.-J. (2002). The nature of FSH induction by GnRH. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13(6), 257-263. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760\(02\)00614-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760(02)00614-8)
- Monniaux, D., Chupin, D. & Saumande, J. (1983). Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19(1), 55-81. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90124-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90124-3)
- Montaño, E. L. & Cortés, Z. T. R. (2016). ¿Por qué no ovulan los primeros folículos dominantes de las vacas cebú posparto en el trópico colombiano? *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(2), 127-135.
- Morató, R. & Mogas, T. (2014). New device for the vitrification and in-straw warming of in vitro produced bovine embryos. *Cryobiology*, 68(2), 288-293. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.010>
- Murphy, B. D. & Martinuk, S. D. (1991). Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12(1), 27-44.
- Naranjo, C., Beceril, P., Canseco, S., Zárate, G., Soto, E., Rosales, M. & Rosendo, P. (2016). Comparación de dos métodos de transferencia de embriones en el ganado criollo lechero tropical. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 3(7), 113-120.
- Niemann, H. (1991). Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*, 35(1), 109-124. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90151-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90151-3)
- Oliveira, A., Mattos, M. C., Bastos, M. R., Trinca, L. A., Razza, E. M., Satrapa, R. A., . . . Barros, C. M. (2014). Efficiency of superstimulatory protocol P-36 associated with the administration of eCG and LH in Nelore cows. *Theriogenology*, 82(5), 715-719. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.006>
- Peña, S. C., Parejo, J. S., España, F. E., Artiles, I. R., Prieto, M. H., Marín, C. C. P & Martín, J. D. (2004). Dinámica folicular ovárica en vacas repetidoras: estudio ecográfico y perfil de progesterona. *Archivos de zootecnia*, 53(201), 35-46.
- Peter, A. T., Levine, H., Drost, M. & Bergfelt, D. R. (2009). Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian

- dynamics in cattle. *Theriogenology*, 71(9), 1343-1357. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.026>
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P. & Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological reviews*, 92(3), 1235-1316.
- Potau, V. & Carreño de Puig, A. (2007). Gonadotropinas (LH y FSH) y corticotropina (ACTH). *Endocrinología y Nutrición*, 54(2), 109-117. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1575-0922\(07\)71415-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1575-0922(07)71415-8)
- Prieto, G. & Velázquez, P. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Rev Fac Med UNAM*, 45(6), 252-257.
- Pulley, S. L., Wallace, L. D., Mellieon Jr, H. I. & Stevenson, J. S. (2013). Ovarian characteristics, serum concentrations of progesterone and estradiol, and fertility in lactating dairy cows in response to equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology*, 79(1), 127-134. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.017>
- Rall, W. F. (1992). Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Animal reproduction science*, 28(1), 237-245. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90110-Y](https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90110-Y)
- Ramírez, L. & Lílido, N. (2006). El hipotálamo de los mamíferos domésticos. *Mundo Pecuario*, 2(1), 16-17.
- Rippe, C. A. (2009). El ciclo estral. Paper presented at the 2009 Dairy Cattle Reproduction Conference. Minneapolis, MN.
- Roa, N., Linares, T. & Tamasaukas, R. (2010). Métodos y aplicaciones de la criopreservación de oocitos y embriones en bovinos y otros mamíferos. Una revisión. *Revista Científica*, 8(1).
- Rodríguez, N. (2016). Regulación de la expresión y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH): Los glucocorticoides como inhibidores de la reproducción. Revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 13(2), 136-142.
- Roger, M., Lahlou, N., Lindner, D. & Chaussain, J. L. (1993). Exploración de la hormona liberadora de gonadotropinas en pediatría. *Ranke MB. Diagnóstico endocrinológico funcional en niños y adolescentes*. Madrid: Ed Díaz de Santos, 259-278.
- Ruiz, J., Correa, J. & Martínez, M. (2010). Vitrification of bovine oocytes and its use in the parthenogenetic development of embryos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(1), 79-83.
- Salas, M. E., Manjarrez, E. V., Basurto, R. N. & Valdes, A. S. (1994). Extracción y purificación de la hormona luteinizante bovina. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 32(1), 5-17.
- Salgado, R. D., Mejía, A. & Suárez, P. (2011). Eficiencia de la respuesta superovulatoria del ganado Brahman al protocolo P-24. *Revista MVZ Córdoba*, 16(2), 2521-2527.
- Salgado, R. D., Vergara, Ó. D. & Ramírez, L. (2010). Efecto de gonadotropinas sobre la maduración y desarrollo embrionario de oocitos bovinos cultivados in vitro. *Revista MVZ Córdoba*, 15(1), 1954-1960.
- Sampaio, P. C., Alves, N. G., Souza, J. C., Sales, J. N. S., Carvalho, R. J., Lima, R. R., . . . Ascari, I. J. (2015). Comparative efficacy of exogenous eCG and progesterone on endogenous progesterone and pregnancy in Holstein cows submitted to timed artificial insemination. *Animal reproduction science*, 162, 88-94. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.09.014>



- Santi, D., Casarini, L., Marshall, G. R. & Simoni, M. (2018). Follicle-Stimulating Hormone (FSH)☆. In I. Huhtaniemi & L. Martini (Eds.), *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)* (pp. 149-156). Oxford: Academic Press.
- Santos Echeverría, R., Calderón Robles, R. C., Ávila, V., Raymundo, H., Perera-Marín, G., Arreguín Arévalo, J. A., . . . Villa-Godoy, A. (2014). Hormona luteinizante y actividad ovárica en respuesta a kisspeptina-10 y su asociación con IGF-1 y leptina en becerras pre-púberes. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 5(2), 181-200.
- Segner, H., Verburg-van Kemenade, B. M. L. & Chadzinska, M. (2017). The immunomodulatory role of the hypothalamus-pituitary-gonad axis: Proximate mechanism for reproduction-immune trade offs? *Developmental & Comparative Immunology*, 66, 43-60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.004>
- Serdar, E., Kronenberg, H., Melmed, S., Polonsky, K. & Larsen, P. (2009). Fisiología y patología del eje reproductor femenino. *Tratado de Endocrinología de Williams*. Madrid: Elsevier, 569-589.
- Shabankareh, H. K., Seyedhashemi, S. B., Torki, M., Kelidari, H. & Abdolmohammadi, A. (2012). Effects of repeated administration of hCG on follicular and luteal characteristics and serum progesterone concentrations in eCG-superovulated Sanjabi ewes. *Tropical animal health and production*, 44(8), 1865-1871. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-012-0149-6>
- Sirard, M. A., Desrosier, S. & Assidi, M. (2007). In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology*, 68, Supplement 1, S71-S76. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.053>
- Skorupskaitė, K., George, J. T. & Anderson, R. A. (2014). The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Human reproduction update*, 20(4), 485-500.
- Small, J., Colazo, M., Kastelic, J. & Mapletoft, R. (2009). Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology*, 71(4), 698-706. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.045>
- Tirapelli, A. C., Fernandes, C. A., Gioso, M. M., Varago, F. C., Palhão, M., Rossi, T. C. & Garcia, J. A. D. (2014). Redução da resposta superovulatória de fêmeas bovinas superestimuladas com FSH em doses split. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66, 1631-1637.
- Uribe, L. F., Correa, A. & Osorio, J. H. (2009). Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud*, 8(1), 117-131.
- Uribe, V. L., Oba, E. & Souza, M. (2008). Población folicular y concentraciones plasmáticas de progesterona (P4) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. *Archivos de medicina veterinaria*, 40(1), 83-88.
- Vajta, G. & Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65(1), 236-244. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.026>
- Vantman, B. D. & Vega, B. M. (2010). Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(3), 348-362.
- Waltero, È. M. & Días, A. J. (2013). Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH. *Spei Domus*, 9(18).

- Wiltbank, M., Gümen, A. & Sartori, R. (2002). Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, 57(1), 21-52. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00656-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00656-2)
- Williams, G. L. & Amstalden, M. (2010). Understanding postpartum anestrus and puberty in the beef female. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, 28, 55-71.
- Wohlres, S., Arashiro, E. K., Minare, T. P., Fernandes, C. A. C., Grazia, J. G. V., Siqueira, L. G. B., . . . Viana, J. H. M. (2019). Differential expression of LHCGR and its isoforms is associated to the variability in superovulation responses of Gir cattle. *Theriogenology*, 126, 68-74. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.004>
- Yang, W. C., Li, S. J., Tang, K. Q., Hua, G. H., Zhang, C. Y., Yu, J. N., . . . Yang, L. G. (2010). Polymorphisms in the 5' upstream region of the FSH receptor gene, and their association with superovulation traits in Chinese Holstein cows. *Animal reproduction science*, 119(3-4), 172-177. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.02.004>
- Yang, W. C., Yang, L. G., Riaz, H., Tang, K. Q., Chen, L. & Li, S.-J. (2013). Effects in cattle of genetic variation within the IGF1R gene on the superovulation performance and pregnancy rates after embryo transfer. *Animal reproduction science*, 143(1), 24-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.10.008>
- Youngs, C. R. (2011). Cryopreservation of preimplantation embryos of cattle, sheep, and goats. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (54).
- Yurchuk, T., Petrushko, M. & Fuller, B. (2018). Science of cryopreservation in reproductive medicine – Embryos and oocytes as exemplars. *Early Human Development*, 126, 6-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016>
- Zeeshan, J., Qamar, U. & Sathyapal, T. (2015). The role of kisspeptin signalling in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis — current perspective, 66(6), 534-547-534-547. doi: 10.5603/EP.2015.0066

## CAPÍTULO II. ARTÍCULO 1.

### **Embryo production in middle-aged and mature *Bos taurus* x *Bos indicus* cows induced to multiple ovulation in a tropical environment<sup>1</sup>**

Fernando Naranjo Chacón, Felipe Montiel Palacios\*, Rodolfo Canseco Sedano, Concepción Ahuja-Aguirre

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Miguel Ángel de Quevedo s/n esq. Yáñez, Col. Unidad Veracruzana, C.P. 91710, Veracruz, Ver., México.

\*Corresponding author: Felipe Montiel Palacios. fmontiel@uv.mx +52 (229) 9344053.

#### **Abstract**

The objective of the study was to evaluate embryo production in middle-aged and mature *Bos taurus* x *Bos indicus* cows induced to multiple ovulation (MO) in a tropical environment. Twenty-eight cows were assigned into two groups: 1) Middle-aged cows = 4-6 years-old ( $n = 13$ ), and 2) Mature cows = 8-12 years-old ( $n = 15$ ). All donors received the same MO protocol with follicle stimulating hormone in decreasing dose during four days, and two artificial insemination services. Total numbers of corpora lutea at embryo collection, structures collected and viable embryos obtained, as well as recovery rate, were higher in middle-aged cows compared to mature cows ( $P < 0.05$ ). Total number of degenerate embryos and unfertilised oocytes, as well as viability rate, were similar in both groups ( $P > 0.05$ ). In conclusion, the mature cows responded to the MO treatment, but the average of viable embryos recovered per donor was lower than in middle-aged cows. Therefore, the inclusion of cows  $\geq 8$  years-old as donors in MO programmes in tropical environments should be avoided.

**Keywords:** Dual-purpose cattle, Embryo donor, FSH, Superovulation.

---

<sup>1</sup>Artículo científico publicado en la revista Tropical Animal Health and Production. Junio 7, 2019. El formato utilizado es el requerido por la revista para el envío del artículo. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01975-2>

## Introduction

In cattle, induction of multiple ovulation (MO) enhances intensity of selection and contributes to genetic gain (Kasinathan et al., 2015; Jatou et al., 2016). However, the number of embryos produced per donor following induction of MO is highly variable (Center et al 2018). Poor embryo yield may result from low population of ovarian primordial follicles and high incidence of follicular atresia (Durocher et al., 2006).

Age of donor influences the success of MO (Breuel et al., 1991). The older the cow (>9 years-old), the fewer the viable embryos obtained, because there is less availability of ovarian follicles capable to respond to gonadotropins administered during treatment, resulting in less ovulations, lower fertility rate and embryo quality (Landry et al., 2016). Nevertheless, cows older than 8 years of age are commonly used as embryo donors in *Bos taurus* x *Bos indicus* herds in the Mexican tropics. Therefore, the objective of the study was to evaluate embryo production in middle-aged and mature *Bos taurus* x *Bos indicus* cows induced to multiple ovulation (MO) in a tropical environment.

## Materials and methods

The study was conducted in Veracruz, Mexico (Lat. 19° 10' N, Long. 96° 12' W), with tropical wet-dry climate, mean annual temperature of 25 °C and annual rainfall of 1500 mm. Twenty-eight cycling, multiparous *Bos taurus* x *Bos indicus* cows from one herd were used as embryo donors, and assigned into two groups: 1) Middle-aged donors = 4-6 years-old ( $n = 13$ ), and 2) Mature donors = 8-12 years-old ( $n = 15$ ). Body condition score (BCS) of cows was 3.0-3.5 (5-point scale; Houghton et al., 1990). Cows grazed in *Brachiaria brizantha* and *Digitaria eriantha* fields. Each cow received 4 kg of feed concentrate (20% CP) daily throughout the MO programme (29 days before and 16 days during MO treatment), and a supplemental source of salt and minerals *ad libitum*. Forty days before the start of the MO protocol, cows received intramuscularly (IM) vitamins A, D and E, Se and P.

All donors were induced to MO following the same protocol (Bó et al., 2006). Day 0 = intravaginal device with 1.9 g progesterone (CIDR<sup>®</sup>, Zoetis, Mexico) plus 2.5 mg estradiol benzoate (Benzoato de estradiol<sup>®</sup>, Virbac, Mexico) and 50 mg progesterone (Progesterona<sup>®</sup>,

Zoetis, Mexico) IM; Days 4-7 = follicle stimulating hormone (FSH; Folltropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Animal Health Inc., USA) IM at 0600 and 1800 h as follows: 60, 60, 40, 40, 20, 20, 10 and 10 mg FSH on days 4, 5, 6 and 7, respectively; Day 6 = besides FSH, 25 mg dinoprost tromethamine (prostaglandin F<sub>2a</sub>; Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis, Mexico) IM; Day 7 = removal of intravaginal device and, besides FSH, 200 IU equine chorionic gonadotropin (eCG; Novormon<sup>®</sup> 5000, Virbac, Mexico) IM; Day 8 = 0.25 mg gonadotropin-releasing hormone (GnRH; Gonasyn GDR<sup>®</sup>, Virbac, Mexico) IM at 0600 h, and artificial insemination (AI) at 1800 h with frozen-thawed semen; Day 9 = AI at 0600 h; Day 15 = embryo collection.

Before embryo collection, donors were evaluated through transrectal palpation to count the corpora lutea (CL) in both ovaries to estimate the number of structures to be recovered from each cow. Embryo collection was via transcervical using epidural anesthesia. The structures recovered were classified as: unfertilised oocyte, degenerate embryo, blastocyst or morula (Stringfellow and Seidel, 1998). Variables evaluated were total of CL per donor before embryo collection, of structures recovered, viable embryos (blastocysts and morulae), degenerate embryos and unfertilised oocytes, and recovery rate (percentage of structures recovered of total CL) and viability rate (percentage of viable embryos of total structures recovered). The results were analysed with a Student's t test (Statistica 10<sup>®</sup>; StatSoft<sup>®</sup>, Inc., OK, USA). Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

Total of CL counted before embryo collection, and total of structures recovered and of viable embryos obtained, were higher in middle-aged donors ( $P < 0.05$ ; Table 1). Total of degenerate embryos and unfertilised oocytes was similar in both groups ( $P > 0.05$ ; Table 1). Recovery rate was higher in middle-aged ( $75.7 \pm 9.0\%$ ) than in mature ( $45.1 \pm 31.8\%$ ) donors ( $P < 0.05$ ). Viability rate was similar in middle-aged ( $60.7 \pm 18.8\%$ ) and in mature ( $58.4 \pm 36.5\%$ ) donors ( $P > 0.05$ ).

**Table 1** Response to induction of multiple ovulation in middle-aged and mature *Bos taurus* x *Bos indicus* cows (mean  $\pm$  SD)

	Corpora lutea	Structures collected	Viable embryos†	Degenerate embryos	Unfertilised oocytes
Middle-aged cows ( $n = 13$ )	13.8 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	10.6 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>	5.9 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	1.6 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	2.7 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>
Mature cows ( $n = 15$ )	8.2 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>	4.7 $\pm$ 5.9 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	1.6 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Different superscript by column indicates statistical difference ( $P < 0.05$ ).

†Blastocysts and morulae.

## Discussion

In this study, all donors responded to MO treatment, as detection of more than three CL in the donor indicates a positive response to MO (Bó and Mapletoft, 2014). In addition, response to MO is positively correlated with BCS (Jaton et al., 2016; Smuts et al., 2019). In this study, BCS of donors was ideal for cattle raised in the tropics (Mondragón et al., 2016), and it likely contributed to the 100% response.

Response to MO depends on the number of healthy follicles in the follicle pool (Redhead et al., 2018). Advanced age leads to reduction in the number of ovarian follicles available and/or capable of responding to exogenous gonadotropins from MO protocols, resulting in less follicles ovulated and less embryos per donor (Malhi et al., 2005; Landry et al., 2016). Donors older than 8 years of age produce less embryos (Villaseñor et al., 2017), as was observed in this study. Whereas some authors indicate that optimal age for induction of MO is before 5 years-old (Jaton et al., 2016), with a marked decline in response at 10 years-old (Hasler et al., 1983), others report no effect of age of donor on embryo production (Vieira et al., 2014).

The average of viable embryos recovered was higher in middle-aged donors, and it coincided with the 5.7 obtained in Holstein cows by Soria et al. (2017). However, this number was lower than other averages reported, such as 6.5 in cattle of various genotypes and ages (IETS, 2016), and 7.1 in Holstein cows (Mikkola and Taponen, 2017). The high

number of degenerate embryos and unfertilised oocytes following induction of MO can be due to abnormalities in oocyte maturation or asynchrony between oocyte and follicle maturation (Peralta-Torres et al., 2017). The use of exogenous gonadotropins to induce growth and maturation of several follicles can result in oocyte atresia or degeneration during ovulation (Chu et al., 2018). Additionally, elevated temperatures affect oocyte quality and embryo development, increasing embryo mortality (Wolfenson et al., 2000). Reduced response to MO (Hasler et al., 1983; Lonergan and Boland, 2011) and low embryo quality (Chebel et al., 2008; Vieira et al., 2014) have been obtained in donors exposed to heat stress. In this study, elevated temperatures during the period of MO might have contributed to the low average of viable embryos obtained in both mature and middle-aged donors, these latter not reaching the average of 6.5 embryos per donor reported by the IETS (2016).

Although viability rate was not affected by age of donor in this study, rates obtained were lower than those reported in 5-6 year-old (68%; Hossein, 2010) and 6-9 year-old (87%; Andino et al., 2015) dairy donors, and in 1-13 year-old beef donors (51-69%; Center et al., 2018). Elevated temperatures during MO could have contributed to the low viability rate.

In conclusion, the mature cows did respond to MO, but the average number of viable embryos recovered per donor was low in comparison to middle-aged cows. Therefore, the inclusion of cows  $\geq 8$  years-old as donors in MO programmes in tropical environments should be avoided.

## **Funding**

The study was funded by Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana (FMVZ-UV) through project 18547 “Servicios en Reproducción Animal”, and by Mr. Ramón Fuster and Mr. Timoteo Aguirre.

## **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Compliance with Ethical Standards

The Bioethics and Animal Welfare Commission of the FMVZ-UV approved the use of animals and the procedures included in the study.

## References

- Andino, P., Caiza, F., Condo, L., Diaz, H., Reyes, F., Oleas, E., Vargas, J. and Marini, P., 2015. Assessment of two superovulation programs in dairy cows in the Ecuadorian Central Highlands. *Asian Journal of Agricultural and Food Sciences*, 3, 925-931.
- Bó, G.A. and Mapletoft, R.J., 2014. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81, 38-48.
- Bó, G.A., Baruselli, P.S., Chesta, P.M. and Martins, C.M., 2006. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, 65, 89-101.
- Breuel, K.F., Baker, R.D., Butcher, R.L., Townsend, E.C., Inskip, 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.
- Center, K., Dixon, D., Looney, C. and Rorie, R., 2018. Anti-mullerian hormone and follicle counts as predictors of superovulatory response and embryo production in beef cattle. *Advances in Reproductive Sciences*, 6, 22-33.
- Chebel, R.C., Demétrio, D.G.B. and Metzger, J., 2008. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology*, 69, 98-106.
- Chu, Y.L., Xu, Y.R., Yang, W.X. and Sun, Y., 2018. The role of FSH and TGF- $\beta$  superfamily in follicle atresia. *Aging (Albany NY)*, 10, 305-321.
- Durocher, J., Morin, N. and Blondin, P., 2006. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology*, 65, 102-115.
- Hasler, J., McCauley, A., Schermerhorn, E. and Foote, R., 1983. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19, 83-99.
- Hosseini, Z.N.G., 2010. Evaluation of the genetic trend of milk yield in the multiple ovulation and embryo transfer populations of dairy cows, using stochastic simulation. *Comptes Rendus Biologies*, 333, 710-715.
- Houghton, P., Lemenager, R., Moss, G.E. and Hendrix, K., 1990. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. *Journal of Animal Science*, 68, 1428-1437.
- IETS, International Embryo Transfer Society, 2016. 2015 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals.
- Jaton, C., Koeck, A., Sargolzaei, M., Malchiodi, F., Price, C.A., Schenkel, F.S. and Miglior, F., 2016. Genetic analysis of superovulatory response of Holstein cows in Canada. *Journal of Dairy Science*, 99, 3612-3623.
- Kasinathan, P., Wei, H., Xiang, T., Molina, J.A., Metzger, J., Broek, D., Kasinathan, S., Faber, D.C. and Allan, M.F., 2015. Acceleration of genetic gain in cattle by reduction of generation interval. *Scientific Reports UK*, 5, 8674.



- Landry, D.A., Bellefleur, A.M., Labrecque, R., Grand, F.X., Vigneault, C., Blondin, P. and Sirard, M.A., 2016. Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments. *Theriogenology*, 86, 1240-1246.
- Lonergan, P. and Boland, M.P., 2011. Gamete and embryo technology. Multiple ovulation and embryo transfer. In: J.W. Fuquay (ed), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2<sup>nd</sup>. Ed.), Academic Press, San Diego, CA.
- Malhi, P.S., Adams, G.P. and Singh, J., 2005. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biology of Reproduction*, 73, 45-53.
- Mikkola, M. and Taponen, J., 2017. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Follitropin or Pluset. *Theriogenology*, 88, 84-88.
- Mondragón, V., Galina, C.S., Rubio, I., Corro, M. and Salmerón, F., 2016. Effect of restricted suckling on the onset of follicular dynamics and body condition score in Brahman cattle raised under tropical conditions. *Animal Reproduction Science*, 167, 89-95.
- Peralta-Torres, J.A., Aké-López, J.R., Segura-Correa, J.C. and Aké-Villanueva, J.R., 2017. Effect of season on follicular population, quality and nuclear maturation of bovine oocytes under tropical conditions. *Animal Reproduction Science*, 187, 47-53.
- Redhead, A.K., Siewb, N., Lambiec, N., Carnarvonc, D., Ramgattieb, R. and Knights, M., 2018. The relationship between circulating concentration of AMH and LH content in the follicle stimulating hormone (FSH) preparations on follicular growth and ovulatory response to superovulation in water buffaloes. *Animal Reproduction Science*, 188, 66-73.
- Smuts, M.P., de Bruyn, S., Thompson, P.N. and Holm, D.E., 2019. Serum albumin concentration of donor cows as an indicator of developmental competence of oocytes. *Theriogenology*, 125, 184-182.
- Soria, P.M.E., Soria, P.C.A., Argudo, G.D., Serpa, G.G., Méndez, A.S., Torres, I.C. and Guevara, V.G.E., 2017. Superovulación con sincronización de la onda folicular y con celo natural en vacas Holstein. *Revista de Producción Animal*, 29, 40-43.
- Stringfellow, D.A. and Seidel, S.M., 1998. *Manual of the International Embryo Transfer Society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology, emphasizing sanitary precautions*. 3<sup>rd</sup> ed. The Society, Savory Ill.
- Vieira, L.M., Rodrigues, C.A., Mendanha, M.F., Sa Filho, M.F., Sales, J.N.S., Souza, A.H., Santos, J.E.P. and Baruselli, P.S., 2014. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology*, 82, 204-212.
- Villaseñor, G.F., de la Torre, S.J.F., Martínez, V.G., Álvarez, G.H., Pérez, R.S., Palacios, F.J.A., Polanco, S.R. and Montaña, B.M., 2017. Caracterización de la respuesta ovárica a la superovulación en bovino Criollo Coreño utilizando dosis reducidas de FSH. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8, 225-232.
- Wolfenson, D., Roth, Z. and Meidan, R., 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*, 60, 535-547.

## CAPÍTULO III. ARTÍCULO 2.

### **Embryo production after superovulation of bovine donors with a reduced number of FSH applications and increased eCG dose<sup>2</sup>**

Fernando Naranjo Chacón, Felipe Montiel Palacios, Rodolfo Canseco Sedano, Concepción Ahuja-Aguirre\*

Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Miguel Ángel de Quevedo s/n, Esq. Yáñez. C.P. 91710, Veracruz, Ver., México. chacon\_ch@hotmail.com; fmontiel@uv.mx; rcanseco@uv.mx; cahuja@uv.mx

\*Corresponding author: Concepción Ahuja-Aguirre. Email: cahuja@uv.mx.

Declarations of interest: none.

#### **Abstract**

This study evaluated embryo production after superovulation (SO) with a reduced number of FSH applications and increased eCG dose in 26 *Bos taurus* × *Bos indicus* donors. On Day 0, donors received an intravaginal device (CIDR) with 1.9 g of progesterone plus 2.5 mg of estradiol benzoate and 50 mg of progesterone via IM. On Day 4, donors were randomly allotted to one of three SO treatments: 1) 455 IU of Folltropin + 400 IU of eCG (n = 9), 2) 350 IU of Folltropin + 600 IU of eCG (n = 9), and 3) 500 IU of Pluset + 600 IU of eCG (n = 8). In treatment 455 IU of Folltropin + 400 IU of eCG, donors received eight IM Folltropin injections in decreasing dose 12 hours apart from Day 4 to Day 7. On Day 6, at the same time as the Folltropin, donors received via IM 25 mg of dinoprost tromethamine (PGF<sub>2a</sub>). On Day 7, the CIDR was removed, and together with the Folltropin, donors received 200 IU of eCG via IM. In treatment 350 IU of Folltropin + 600 IU of eCG, donors

---

<sup>2</sup>Artículo científico publicado en la revista *Theriogenology*. Volume 141, 1 January 2020, Pages 168-172. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.018>. El formato utilizado es el requerido por la revista.

received four IM Folltropin injections in decreasing dose 12 hours apart on Days 4 and 5. On Day 6, donors received via IM 600 IU of eCG in the morning and two doses of 25 mg of PGF<sub>2a</sub> 12 hours apart. On Day 7, the CIDR was removed. Donors from treatment 500 IU of Pluset + 600 IU of eCG received four IM Pluset injections in decreasing dose 12 hours apart on Days 4 and 5. On Day 6, donors received via IM 600 IU of eCG in the morning and two doses of 25 mg of PGF<sub>2a</sub> 12 hours apart. On Day 7, the CIDR was removed. In the morning of Day 8, donors from the three treatments received 0.25 mg of GnRH via IM. Artificial insemination was performed on Day 8 (pm) and Day 9 (am). Embryos were collected on Day 15. Variables evaluated were number of CL before embryo collection, number of structures recovered, transferable embryos, degenerate embryos and unfertilized oocytes, recovery rate, and viability rate. There was no difference in any variable among treatments ( $P > 0.05$ ). In conclusion, replacement of four Folltropin or Pluset injections from a conventional eight FSH-injection SO protocol, by a single injection of 600 IU of eCG, is a good alternative to reduce donor handling without decreasing yield of transferable embryos.

**Keywords:** Folltropin; Pluset; eCG; superovulation; embryo; bovine donor.

## **1. Introduction**

In cattle, superovulation (SO) is widely used to stimulate growth and maturation of a higher number of small antral follicles through gonadotropin administration, and to induce multiple ovulations that result in a greater number of transferable embryos with a high probability of producing pregnancies [1-3]. Even though the goal of SO is to obtain more offspring from genetically superior dams, over the last 40 years the average number of transferable embryos recovered per SO program per donor cow has remained at about six [4].

Protocols used for SO include a single IM administration of equine chorionic gonadotropin (eCG), or twice-daily IM administration for 4 days of purified follicle stimulating hormone (FSH) extracted from porcine pituitaries [5]. The eCG is a complex glycoprotein with both FSH and luteinizing hormone (LH) activity that has a half-life of over 40 hours in the cow and persists in the circulation for up to 10 days [6,7]. The long life and high LH activity of eCG cause unwanted effects, such as prolonged ovarian stimulation, unovulated follicles,

presence of large follicles at embryo collection, and deterioration of embryo quality [7-9]. On the other hand, FSH has a short half-life, of approximately 5 hours in the cow, which makes it necessary to administer it twice daily to induce SO effectively [10,11].

There are two products commercially available for SO in cattle; both contain FSH derived from porcine pituitary, but may differ in their LH content. Folltropin (Vetoquinol USA, Inc., USA) has presumedly an FSH:LH ratio of 1:0.12, while Pluset (Laboratorios Calier de Argentina S.A.) has a supposed FSH:LH ratio of 1:1 [12]. However, both products require twice daily IM administration for 4 days, which demands more work by farm personnel, increasing the possibilities of errors, as well as repeated donor handling, which can cause stress and result in decreased ovulatory response and inhibited preovulatory LH surge [2,13,14].

To improve embryo production after SO, some studies have tested the replacement of the last two doses of Folltropin by eCG with contrasting results. In this respect, in *Bos indicus* cattle, Barros et al. [15] reported increased number of structures recovered in Nelore cows, and Mattos et al. [16] obtained a greater SO response and embryo quality in Sindhi donors. On the contrary, in *Bos taurus* beef cows, Davis et al. [17] observed no improvement in embryo production. Nonetheless, both treatments still require twice-daily IM administration of hormones for 4 days.

To reduce donor handling during SO, two studies were conducted on Bonsmara (*Bos taurus*) cows, replacing the last four Folltropin injections by a single injection with 800 IU of eCG [18], or by a single injection with either 600 or 800 IU of eCG [19]; the results showed no difference in number of corpora lutea (CL) and transferable embryos among treatments. Therefore, the aim of the study was to evaluate embryo production after SO of *Bos taurus* × *Bos indicus* donors with four Folltropin or Pluset injections plus a single dose of 600 IU of eCG vs. the conventional SO protocol of eight Folltropin injections plus two doses of 200 IU of eCG each.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Study location**

The study was conducted at the Posta Zootecnica Torreon del Molino, owned by the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana (FMVZ-UV),

located in Veracruz, Mexico, at Lat. 19° 10' N, Long. 96° 12' W, with mean annual temperature of 25 °C and annual rainfall of 1500 mm.

## 2.2. Characteristics and management of donors

The Bioethics and Animal Welfare Commission of the FMVZ-UV approved the use of animals and the procedures included in the study.

Twenty-six *Bos taurus* × *Bos indicus* (5/8 Holstein × 3/8 Zebu, and 5/8 Brown Swiss × 3/8 Zebu) multiparous cows were used as embryo donors. Cows were 5 years-old, averaged 454.0 ± 6.1 kg of live weight and their body condition score (BCS) ranged from 2.5 to 3.0 (5-point scale: 1 = emaciated and 5 = obese) [20]. At the time of selection, all donors were evaluated through transrectal palpation of reproductive organs to corroborate their cycling status, the adequate cervical morphology to allow the passage of the embryo collection catheter (determined by passing a transfer catheter transcervically in each donor), and the absence of pathologies in the reproductive tract.

Donors were kept in a stable and each one received daily 2 kg of feed concentrate (20% crude protein), 30 kg of maize silage, 10 kg of Pangola grass (*Digitaria eriantha*) hay and a supplemental source of salt and minerals *ad libitum*, from 45 days before the start of SO treatment until embryo collection.

On Day -45 (Day 0 = start of SO treatment), donors were treated against endoparasites and ectoparasites. On Day -40, donors received via IM a combination of vitamins A, D and E (1 250 000, 350 000 and 350 IU, respectively; Synt-ADE, Zoetis, Mexico), selenium plus vitamin E (40 and 400 mg, respectively; Selenie, Virbac, Mexico), and phosphorus (2 g; Phospho 20, Virbac, Mexico).

## 2.3. Superovulation treatments

Donors were superovulated at a random stage of their estrous cycle. On Day 0, donors received an intravaginal device with 1.9 g of progesterone (CIDR, Zoetis, Mexico), together with 2.5 mg of estradiol benzoate (EB; Benzoato de estradiol, Virbac, Mexico) and 50 mg of progesterone (Progesterona, Zoetis, Mexico) via IM, to induce a new follicular wave [21]. On Day 4, donors were randomly allotted to one of three SO treatments: 1) 455 IU of

Folltropin + 400 IU of eCG (n = 9), 2) 350 IU of Folltropin + 600 IU of eCG (n = 9), and 3) 500 IU of Pluset + 600 IU of eCG (n = 8).

Donors assigned to treatment 455 IU of Folltropin + 400 IU of eCG received eight IM injections of Folltropin (total dose: 455 IU of FSH; Folltropin-V, Bioniche Animal Health USA, Inc., USA) in decreasing dose 12 hours apart from Day 4 to Day 7. On Day 6, at the same time as the Folltropin doses, donors received 25 mg of dinoprost tromethamine (Lutalyse, Zoetis, Mexico) via IM. On Day 7, the intravaginal device was removed in the morning and at the same time as the Folltropin doses, donors were given via IM 200 IU of eCG (Novormon 5000, Virbac, Mexico).

Donors from treatment 350 IU of Folltropin + 600 IU of eCG (n = 9) received four IM injections of Folltropin (total dose: 350 IU of FSH) in decreasing dose 12 hours apart on Days 4 and 5. On Day 6, donors were given via IM 600 IU of eCG in the morning and two doses of 25 mg of dinoprost tromethamine 12 hours apart. In the morning of Day 7, the intravaginal device was removed.

Donors assigned to treatment 500 IU of Pluset + 600 IU of eCG (n = 8) received four IM injections of Pluset (total dose: 500 IU of FSH-LH) in decreasing dose 12 hours apart on Days 4 and 5. On Day 6, donors were given via IM 600 IU of eCG in the morning, and two doses of 25 mg of dinoprost tromethamine 12 hours apart. In the morning of Day 7, the intravaginal device was removed.

In the morning of Day 8, all donors from the three treatments received 0.25 mg of gonadotropin-releasing hormone (GnRH; GONASYN GDR, Virbac, Mexico) via IM. Artificial insemination (AI) was performed in the evening of Day 8 (12 hours after GnRH) using two straws of frozen-thawed semen per cow, and in the morning of Day 9 (12 hours after first AI) using one semen straw. Embryos were collected on Day 15. The treatment protocols are shown in Figure 1.

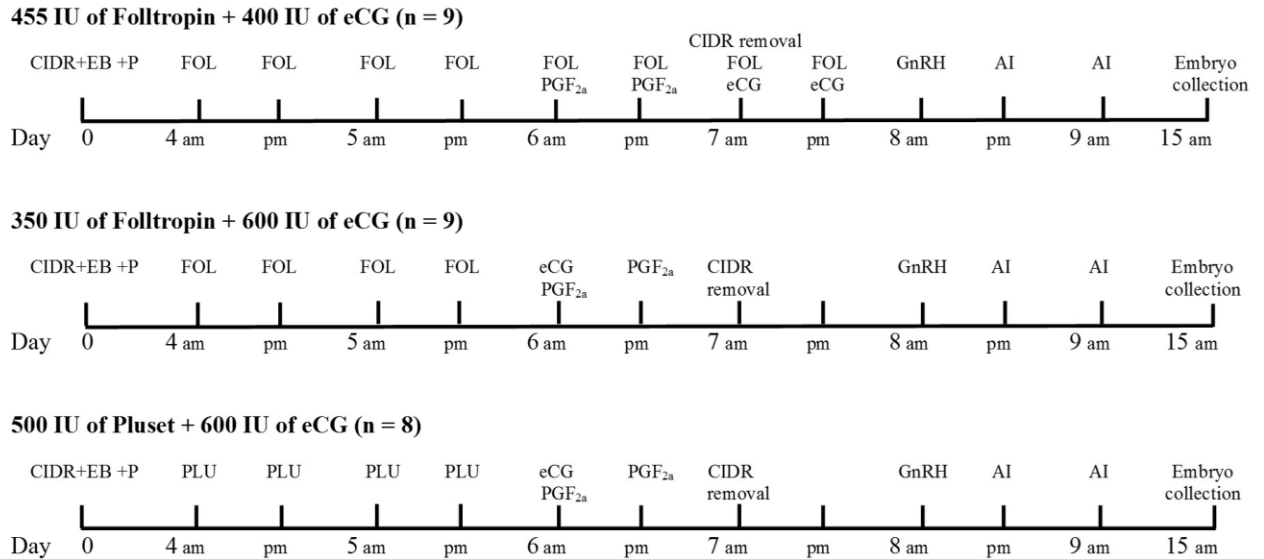


Figure 1. Experimental superovulation treatments. Treatment 1) 455 IU of Folltropin + 400 IU of eCG: 455 IU of Folltropin-V (FOL) administered as eight decreasing doses 12 hours apart for 4 days (105-105,70-70, 35-35 and 17.5,17.5 IU on Days 4, 5, 6 and 7); 25 mg of PGF<sub>2a</sub> 12 hours apart on Day 6; 200 IU of eCG 12 hours apart on Day 7. Treatment 2) 350 IU of Folltropin + 600 IU of eCG: 350 IU of Folltropin given as four decreasing doses 12 hours apart for 2 days (105-105 and 70-70 IU on Days 4 and 5); 600 IU of eCG on Day 6; 25 mg of PGF<sub>2a</sub> 12 hours apart on Day 6. Treatment 3) 500 IU of Pluset + 600 IU of eCG: 500 IU of Pluset (PLU) administered as four decreasing doses 12 hours apart for 2 days (150-150 and 100-100 IU on Days 4 and 5); 600 IU of eCG on Day 6; 25 mg of PGF<sub>2a</sub> 12 hours apart on Day 6. Three protocols: CIDR = intravaginal device with 1.9 g of progesterone + EB = 2.5 mg of estradiol benzoate + P = 50 mg of progesterone on Day 0; CIDR removal on Day 7; GnRH = 0.25 mg on Day 8. AI: artificial insemination. All hormones, with the exception of the intravaginal P, were administered via IM.

#### 2.4. Embryo collection

Before embryo collection, donors were evaluated by ultrasonography to record the number of CL present in both ovaries, to estimate the number of structures that could be recovered from each cow [12]. The epidural, perineal and vulvar regions were disinfected with iodopovidone and ethanol. Epidural anesthesia (160 mg lidocaine) was used to perform embryo collection.

Embryo collection was via transcervical, using an 18- to 20-Fr two-way Foley catheter with 30 cc balloon. The uterus was flushed using 1 L per cow (500 mL per uterine horn) of embryo collection medium (Vigro Complete Flush Solution, Bioniche, USA), and embryos were recovered in a 100- $\mu$ m embryo filter (Emcon filter, Immuno Systems Inc., USA). At the laboratory, the content from the embryo collection filter was poured into a 100  $\times$  15 mm Petri dish containing holding medium (Vigro Complete Holding Solution, Bioniche, USA). Then, with the aid of a stereoscopic microscope, the embryos were identified and selected, and the structures recovered were classified as: a) unfertilized oocyte, b) degenerate embryo, c) blastocyst, and d) compact morula [22]. The quality of compact morulae and blastocysts was graded according to the IETS [22], and only those of excellent or good quality (Grade 1) were considered as transferable.

### 2.5. Statistical analysis

The variables evaluated were number of CL detected before embryo collection (response to SO), number of structures recovered, number of transferable embryos (compact morulae and blastocysts), number of degenerate embryos, number of unfertilized oocytes, recovery rate (percentage of structures recovered of the total CL), and viability rate (percentage of transferable embryos of the total of structures recovered). Differences in all variables among treatments were analyzed with one-way ANOVA following a linear model ( $y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$ , where:  $i = 1, 2, 3$ ,  $j = 1, \dots, n$ ,  $y_{ij}$  = the  $j$ th observation for the  $i$ th treatment,  $\mu$  = overall mean,  $\alpha_i$  = effect of the  $i$ th treatment,  $\varepsilon_{ij}$  = random error) (Statistica 10; StatSoft, Inc., OK, USA). Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

## 3. Results

Response to SO, measured by the number of CL detected before embryo collection, was similar among treatments ( $P > 0.05$ ; Table 1). Total of structures recovered, transferable embryos, degenerate embryos, and unfertilized oocytes were similar in all treatments ( $P > 0.05$ ; Table 1).



Table 1. Response to induction of superovulation (mean  $\pm$  SD) in *Bos taurus*  $\times$  *Bos indicus* cows treated with different FSH source and eCG dose.

Treatment	Corpora lutea	Structures recovered	Transferable embryos <sup>†</sup>	Degenerate embryos	Unfertilized oocytes
455 IU of Folltropin + 400 IU of eCG (n = 9)	18.5 $\pm$ 2.0	15.2 $\pm$ 2.0	7.7 $\pm$ 1.2	4.0 $\pm$ 1.1	3.4 $\pm$ 0.8
350 IU of Folltropin + 600 IU of eCG (n = 9)	13.6 $\pm$ 2.0	9.1 $\pm$ 2.0	7.5 $\pm$ 1.2	0.7 $\pm$ 1.1	0.7 $\pm$ 0.8
500 IU of Pluset + 600 IU of eCG (n = 8)	13.5 $\pm$ 2.1	10.1 $\pm$ 2.1	7.3 $\pm$ 1.3	1.5 $\pm$ 1.2	1.2 $\pm$ 0.9

There was no statistical difference by column in any variable ( $P > 0.05$ ).

<sup>†</sup>Transferable embryos include compact morulae and blastocysts Grade 1 [22].

The recovery rate and the viability rate were similar in all treatments ( $P > 0.05$ ; Table 2).

Table 2. Recovery rate and viability rate (mean  $\pm$  SD) after induction of superovulation with different FSH source and eCG dose in *Bos taurus*  $\times$  *Bos indicus* cows.

Treatment	Recovery rate <sup>†</sup> %	Viability rate <sup>‡</sup> %
455 IU of Folltropin + 400 IU of eCG (n = 9)	79.5 $\pm$ 7.0	58.4 $\pm$ 7.0
350 IU of Folltropin + 600 IU of eCG (n = 9)	74.1 $\pm$ 7.0	82.6 $\pm$ 7.0
500 IU of Pluset + 600 IU of eCG (n = 8)	70.8 $\pm$ 8.0	74.1 $\pm$ 8.0

There was no statistical difference by column in any variable ( $P > 0.05$ ).

<sup>†</sup>Percentage of structures recovered of the total CL present.

<sup>‡</sup>Percentage of transferable embryos of the total of structures recovered.

#### 4. Discussion

The number of embryos produced by donor following SO is unpredictable [23,24], due to high variability in the individual ovarian response after administration of exogenous gonadotropins [12]. Some studies have reported reduced variability in the ovarian response and improved embryo quality after SO with Folltropin in comparison with Pluset [5,25].

Other studies have found no difference in the number of transferable embryos or in the quality of embryos recovered after SO with either of the two FSH products [12,26], as was observed in the present study. Some authors obtained a positive effect on SO response and on embryo number and quality when the last two doses of Folltropin within the conventional eight Folltropin-injection protocol were replaced by eCG [15-17].

However, application of such SO protocols requires twice-daily IM administration of hormones for 4 days. The need to repeat FSH injections six or eight times increases the possibility of errors [27], particularly when treating donors with irritable temperament, such as Zebu breeds [28], and increases stress due to handling, which can result in decreased superovulatory response [2,14]. Nelore cows handled daily or weekly within a reproductive program had high plasma cortisol levels and elevated progesterone levels from adrenal origin [29], which could affect the results of SO.

Hence, studies have been conducted to reduce the number of hormone injections in the donors, without affecting the number and quality of embryos recovered [30,31]. For example, in Holstein donors that received either eight or five IM injections of Folltropin or Pluset in decreasing dose at 12-hour interval within a SO program, similar results were obtained in the number of structures, viable embryos, degenerate embryos, and unfertilized oocytes recovered [32]. In Bonsmara (*Bos taurus*) donors superovulated with either eight or four Folltropin injections followed by one dose of 800 IU of eCG [18], or with four Folltropin injections and a single dose of either 600 or 800 IU of eCG [19], there was no difference in the number of CL and transferable embryos among treatments.

Based on these results, we decided to administer only the first four of eight Folltropin or Pluset injections from the conventional SO treatments, and replace the last four respective injections with a single dose of 600 IU of eCG, to decrease the number of times donors had to be handled. The substitution of four Folltropin or Pluset injections by one eCG injection represents less handling of animals, and therefore, less stress for them; less injections also make SO protocols easier to use. Thus, by eliminating the last four Folltropin injections from the first treatment, which totaled 105 IU of FSH, we ended comparing 455 IU vs. 350 IU of FSH in the first and second treatments. Likewise, the comparison of 350 IU of FSH from the second treatment vs. 500 IU of FSH-LH from the third treatment resulted from the total amount of FSH and FSH-LH contained in the four injections of Folltropin and Pluset,

respectively, that were administered. On the other hand, the reason for comparing Folltropin vs. Pluset was that in Mexico, Pluset is cheaper and easier to purchase than Folltropin. Thus, the availability of a product that is more affordable and with similar results to Folltropin could contribute to lower the costs of SO and likely spread the use of SO protocols in crossbred cattle herds.

When our results were compared with those reported by Barajas et al. [18] after SO with four doses of Folltropin and one dose of 800 IU of eCG, the number of CL obtained was similar, but the number of transferable embryos was higher in our study. Moreover, unlike what was expected, when the results from the present study were compared with those from Barajas et al. [19] following SO with four Folltropin injections and a single dose of either 600 or 800 IU of eCG, the numbers of both CL and transferable embryos were higher in this study.

In this study, the SO response (number of CL) and the number of structures and of transferable embryos recovered were similar in all treatments. In this case, the higher eCG dose from the 350 IU of Folltropin + 600 IU of eCG and the 500 IU of Pluset + 600 IU of eCG treatments used to replace the last four Folltropin and Pluset doses from the conventional eight FSH-injection protocol was sufficient to stimulate follicle growth and ovulation, most likely due to its FSH-LH activity and long half-life, and because FSH and LH receptors were already present in the follicles because of ovarian stimulation by the first four FSH injections [6,7,16,33]. Thus, it is possible to replace the last four injections of Folltropin or Pluset and two injections of eCG within the conventional SO protocol, by only one higher dose of eCG; it is also possible to use Pluset instead of Folltropin without compromising the SO response and the number of transferable embryos obtained. This is a good alternative to reduce donor handling and therefore stress, particularly in females of *Bos indicus* origin that are more difficult to handle due to their irritable temperament [28], such as the *Bos taurus* × *Bos indicus* crosses used in this study, which are predominant in tropical regions.

In this study, the viability rate varied from 58.4% to 82.6%. These results were similar to the viability rate of 76.5% in Sindhi donors treated with six Folltropin injections followed by two eCG injections [16]. However, in the later study, eight Folltropin/eCG injections were given, in comparison with only five Folltropin/eCG or Pluset/eCG injections in this

study. It is possible that because of the long half-life of eCG in the blood, a single dose of 600 IU of eCG administered in this study was able to replace the follicular superstimulatory effect of the last four doses of Folltropin included in the conventional SO treatments, yielding comparable results but with less handling of donors.

## 5. Conclusions

The replacement of the last four Folltropin injections within a conventional eight Folltropin-injection SO treatment, by a single injection with 600 IU of eCG, is a good alternative to reduce donor handling in *Bos taurus* × *Bos indicus* cows, without decreasing the yield of transferable embryos. Additionally, similar response to SO was obtained when Folltropin or Pluset were used.

## Acknowledgements

To Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana (project 18547 “Servicios en Reproducción Animal”), and Mr. Timoteo Aguirre, for providing the animals and funding to conduct this study.

## References

- [1] Kimura K. Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. *J Reprod Dev* 2016;62:423-9. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-066>.
- [2] Bó GA, Rogan DR, Mapletoft RJ. Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. *Theriogenology* 2018;112:26-33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.034>.
- [3] Center K, Dixon D, Looney C, Rorie R. Anti-mullerian hormone and follicle counts as predictors of superovulatory response and embryo production in beef cattle. *Adv Reprod Sci* 2018;6:22-33. <https://doi.org/10.4236/arsci.2018.61003>.
- [4] Hasler JF. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 2014;81:152-69. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>.

- [5] Mapletoft RJ, Bennett-Steward K, Adams GP. Recent advances in the superovulation of cattle. *Reprod Nut Dev* 2002;42:601-11. <https://doi.org/10.1051/rnd:2002046>.
- [6] Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev* 1991;12:27-44. <https://doi.org/10.1210/edrv-12-1-27>.
- [7] Dieleman SJ, Bevers MM, Vos PLAM, de Loos FAM. PMSG/anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 1993;39:25-42. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90022-W](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90022-W).
- [8] Jensen AM, Greve T, Madej A, Edqvist LE. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2alpha treated cow. *Theriogenology* 1982; 18:33-44. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(82\)90046-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(82)90046-2).
- [9] Gonzalez A, Wang H, Carruthers T, Murphy B, Mapletoft R. Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology* 1994;41:1631-42. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90828-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90828-7).
- [10] Monniaux D, Chupin D, Saumande J. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 1983;19:55-81. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90124-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90124-3).
- [11] Walsh JH, Mantovani R, DUBY RT, Overstrom EW, Dobrinsky JR, Enright WJ, et al. The effects of once or twice daily injections of p-FSH on superovulatory response in heifers. *Theriogenology* 1993;40:313-21. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90269-B](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90269-B).
- [12] Mikkola M, Taponen J. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. *Theriogenology* 2017;88:84-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.052>.
- [13] Stoebel DP, Moberg GP. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J Dairy Sci* 1982;65:92-6. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82157-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82157-7).
- [14] Edwards LM, Rahe CH, Griffin JL, Wolfe DF, Marple DN, Cummins KA, et al. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. *Theriogenology* 1987; 28:291-9. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(87\)90016-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(87)90016-1).
- [15] Barros CM, Barcelos ACZ, Gouvêa LM, Meneghel M, Barcelos DS, Barcelos LN, et al. Improvement of a superstimulatory protocol in Nelore cows: replacing the last two

- doses of pFSH by eCG. *Reprod Fert Develop* 2008;20:152 (abst.). <https://doi.org/10.1071/RDv20n1Ab143>.
- [16] Mattos MCC, Bastos MR, Guardieiro MM, Carvalho JO, Franco MM, Mourão GB, et al. Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. *Anim Reprod Sci* 2011;125:119-23. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.028>.
- [17] Davis RL, Arteaga A, Hasler JF. Addition of equine chorionic gonadotropin to a traditional follicle stimulating hormone protocol for superovulation of *Bos taurus* beef cows. *Reprod Fert Develop* 2011;24:224-5. <https://doi.org/10.1071/RDv24n1Ab225>.
- [18] Barajas JL, Andrada S, Ortega JA, Cedeño A, Oviedo JM, Tribulo A, et al. Uso de la eCG en tratamientos superestimulatorios con FSH en donantes de embriones bovinos de razas de carne. XII Simposio Internacional de Reproducción Animal-IRAC 2017. Córdoba, Argentina; 2017a, p. 408.
- [19] Barajas JL, Ortega JA, Andrada S, Cedeño A, Oviedo JM, Carbel JA, et al. Tratamientos superestimulatorios combinando FSH y eCG en donantes de embriones bovinos de razas de carne. XII Simposio Internacional de Reproducción Animal-IRAC 2017. Córdoba, Argentina; 2017b, p. 409.
- [20] Houghton P, Lemenager R, Moss GE, Hendrix K. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. *J Anim Sci* 1990;68:1428-37. <https://doi.org/10.2527/1990.6851428x>.
- [21] Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 1995;43:31-40. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00010-R](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00010-R).
- [22] Stringfellow DA, Givens MD. *Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures*. 4<sup>th</sup> ed, International Embryo Transfer Society, Savory, Ill.; 2010.
- [23] Stroud B, Hasler JF. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology* 2006;65:65-76. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.007>

- [24] Lonergan P, Boland MP. Gamete and embryo technology. Multiple ovulation and embryo transfer. In: Fuquay JW, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences, San Diego: Academic Press; 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00201-6>.
- [25] Bó G, Mapletoft R. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 2014;81:38-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>.
- [26] Martens G, Nohner HP, Leiding C, Schneider F, Becker F, Nuernberg G, et al. Optimizing frequency of FSH application for superovulatory treatment in cattle. *Reprod Fert Develop* 2004;17:313-4. <http://dx.doi.org/10.1071/RDv17n2Ab326>.
- [27] Mapletoft RJ, Bo GA. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fert Develop* 2011;24:278-83. <https://doi.org/10.1071/RD11919>.
- [28] Alvarez RH, Martinez AC, Pires RML. Superovulatory response of zebu cows treated with pFSH in a single subcutaneous injection followed by an additional intramuscular sub-dose 48 h later. *Reprod Domest Anim* 2010;45:421-4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01209.x>.
- [29] Maziero RRD, Mattos MCC, Martin I, Oba E, Sartori R, Ferreira JCP. Cortisol and progesterone plasmatic concentrations in Nelore cows (*Bos taurus indicus*) submitted to daily or weekly handling. (Concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas nelore (*Bos taurus indicus*) submetidas a manejo diário ou manejo semanal). *Acta Sci Vet* 2007;35(Supl. 3): S1034 (Abstract).
- [30] Carvalho PD, Hackbart KS, Bender RW, Baez GM, Dresch AR, Guenther JN, et al. Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: A preliminary study. *Theriogenology* 2014;82:481-9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.011>.
- [31] Biancucci A, Sbaragli T, Comin A, Sylla L, Monaci M, Peric T, et al. Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol? *Theriogenology* 2016;85:914-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.041>.

- [32] Garcia PD, Lemos FO, Moreira EM, Lemos TN, Hucke EETS. Superovulatory response of bovine donors using five or eight injections of swine FSHp. (Resposta superovulatória de doadoras bovinas utilizando cinco ou oito aplicações de FSHp suíno). *Acta Sci Vet* 2006;34(Suppl. 1):s289.
- [33] Nogueira MFG, Buratini J, Price CA, Castilho AC, Pinto MG, Barros CM. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol Reprod Dev* 2007;74:680-6. <https://doi.org/10.1002/mrd.20656>



## CAPÍTULO IV. ARTÍCULO 3.

### Tasa de gestación con embriones bovinos criopreservados por congelación lenta y vitrificación en Veracruz, México<sup>3</sup>

Naranjo CF<sup>a\*</sup>, Montiel PF<sup>a</sup>, Canseco SR<sup>a</sup>, Ahuja ACC<sup>a</sup> y Zárte GOE<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Miguel Ángel de Quevedo s/n esq. Yáñez, Col. Unidad Veracruzana, C.P. 91710, Veracruz, Ver. México.

[\\*chacon\\_ch@hotmail.com](mailto:chacon_ch@hotmail.com)

### INTRODUCCIÓN

En México, el sistema ganadero predominante es el doble propósito, que utiliza cruza de *Bos taurus x Bos indicus* para la producción de leche y carne. Veracruz cuenta con el mayor inventario de ganado bovino del país, por lo que es trascendental implementar estrategias para aumentar su productividad, tales como las biotecnologías reproductivas que permiten rescatar el potencial productivo innato de los animales (García *et al.*, 2018). A nivel mundial, durante varias décadas la transferencia de embriones (TE) en bovinos se ha empleado para mejorar la genética de los hatos ganaderos, mediante la obtención de un mayor número de crías de donadoras destacadas en la producción de leche o carne. Aunque el éxito de la TE depende de muchos factores, la criopreservación de los embriones es uno de los más importantes. Actualmente los métodos utilizados para este fin son la congelación lenta (CL) y la vitrificación (Vit), con los que se han reportado tasas de gestación de 35 a 55% y 35 a 65%, respectivamente (Youngs, 2011).

---

<sup>3</sup>Publicado como capítulo de libro científico del IV Congreso de la Asociación de Médicos Veterinarios Zootecnistas Especialistas en Bovinos del Estado de Veracruz, A. C. Ganadería Sustentable. Abril 2, 3 y 4 de 2019. El formato utilizado es el solicitado para su inclusión en el libro científico.

## **OBJETIVO**

Determinar la tasa de gestación pos-transferencia de embriones bovinos producidos *in vivo* y criopreservados por curva lenta y vitrificación.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en la unidad de producción pecuaria de doble propósito denominada “Rancho Acapulco”, localizada en el municipio de Las Choapas, Ver., a Latitud 18° 02’ N y Longitud 94° 07’ O, con clima tropical (Aw), temperatura media anual de 27 °C y precipitación anual de 2900 mm.

### **Embriones y selección de receptoras**

Se contó con un banco de 80 embriones producidos *in vivo* de donadoras Suiz-Bú (5/8 Suizo x 3/8 Cebú), de los cuales 40 fueron criopreservados por CL (pajilla) y 40 fueron criopreservados por Vit (Cryotop®). Para realizar la transferencia de los embriones se seleccionaron 130 vacas *Bos taurus* x *Bos indicus* con edad promedio de  $60.6 \pm 2.7$  meses, peso vivo promedio de  $454 \pm 6$  kg, condición corporal de  $2.7 \pm 0.5$  en escala de 5 (0 = emaciado y 5 = obeso), con al menos dos partos y reproductivamente sanas. Todas las receptoras fueron evaluadas mediante ultrasonografía para identificar la presencia de un cuerpo lúteo o un folículo mayor a 10 mm, verificar que tuvieran el cérvix en buen estado y que no presentaran patologías en el aparato reproductor, siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Tecnologías Embrionarias (IETS: International Embryo Technology Society).

Las receptoras se mantuvieron en un sistema semi-estabulado que consistió en el pastoreo de pasto pangola (*Digitaria eriantha*) bajo un sistema de rotación de potreros cada tres semanas, así como la suplementación diaria con 2 kg de alimento concentrado con 20% de proteína cruda (Pasturina, Purina®, México) por receptora, además de sales minerales y agua a libre acceso. Todas las receptoras fueron desparasitadas contra endoparásitos y ectoparásitos, además se les aplicó vitaminas y minerales vía intramuscular (IM) 40 días antes de que se realizara la TE.

## **Tratamiento de sincronización de la ovulación para transferencia de embriones**

El Día 0 (cero) todas las receptoras recibieron un dispositivo intravaginal con 1.9 g de progesterona (CIDR<sup>®</sup>, Zoetis, México), más la aplicación IM de 2.5 mg de benzoato de estradiol (Benzoato de estradiol<sup>®</sup>, Virbac, México) y 50 mg de progesterona (Progesterona<sup>®</sup>, Zoetis, México). El Día 5 todas las receptoras recibieron 300 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) vía IM (Novormon<sup>®</sup> 5000, Virbac, México) más 25 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis, México) vía IM. El Día 8 se retiró el dispositivo intravaginal y se aplicó 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P.<sup>®</sup>, Zoetis, México). En el Día 17 se realizó la TE.

## **Descongelación de embriones criopreservados por CL**

Inmediatamente antes de realizar la TE se extrajeron del termo criogénico las pajillas de embriones criopreservados por CL, se expusieron 10 s al aire, se sumergieron en agua a 37 °C por 40 s, se secaron con papel absorbente, se les retiró el tapón del extremo y se colocaron en el aplicador para transferencia.

## **Calentamiento de embriones vitrificados**

Los embriones Vit fueron calentados antes de ser transferidos. Para esto, se requirió de una solución de calentamiento (TS), compuesta por solución *buffer* fosfato (PBS) (Bioniche<sup>®</sup>, Pharma, Canadá) más sustituto de suero sintético (SSS) al 20% y sacarosa 1 M (Sigma Aldrich<sup>®</sup>); una solución de dilución (DS), compuesta por PBS más SSS al 20% y sacarosa 0.5 M; y una solución de lavado (WS), compuesta de PBS y SSS al 20%. Se colocó una gota (300 µl) de TS en un plato Petri (60 x 15 mm; Petri Dish, BD Falcon<sup>™</sup>, EUA) a 37 °C, y en otro plato Petri (100 x 15 mm; Petri Dish) se colocaron dos gotas de DS y tres gotas de WS de 20 µl cada una a temperatura ambiente. Para calentar los embriones se sacó el Cryotop<sup>®</sup> del nitrógeno líquido, se destapó y de inmediato se sumergió en TS por 1 min. Después, los embriones fueron colocados en DS 2 min en cada gota y por último se

colocaron en WS 3 min en cada gota. Después, cada embrión fue cargado en una pajilla de 0.25 ml con PBS y ésta se colocó en el aplicador para transferencia.

### **Procedimiento de transferencia de embriones**

Antes de realizar la TE, las 130 receptoras fueron evaluadas por ultrasonografía (ecógrafo Mindray Dp 10) para verificar la presencia de un cuerpo lúteo (de 18 mm de diámetro o más) en alguno de los ovarios, para poder ser candidata para recibir un embrión. Posteriormente, en cada receptora se realizó asepsia de la zona epidural, perineal y labios vulvares utilizando iodopovidona y alcohol etílico al 70%. Se aplicó anestesia epidural con 100 mg de lidocaína (Pisacaína® 2%, Pisa®, México) para facilitar el proceso de transferencia. Al aplicador de transferencia cargado con el embrión se le colocó una funda protectora y estéril especial para TE. El aplicador se introdujo en la vagina y se hizo pasar por el canal del cérvix mediante manipulación rectal, guiándolo hacia el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo; el embrión se depositó lo más profundo posible en el cuerno uterino. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ecografía 60 días pos-transferencia. El diseño experimental fue completamente al azar, con dos tratamientos (CL y Vit) y 40 repeticiones cada uno. Los datos obtenidos (receptora gestantes y no gestantes) se analizaron con Ji-cuadrada con el software STATISTICA versión 10.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se realizó la sincronización de la ovulación a 130 receptoras, de las cuales respondieron al tratamiento 105 (80.7%), presentando un cuerpo lúteo óptimo para TE. De éstas, se eligieron 80 al azar para recibir un embrión. Los tratamientos de sincronización basados en estrógenos han permitido controlar la ovulación de manera confiable, optimizando los programas de ovulación múltiple y TE. Se obtuvo similar tasa de gestación pos-transferencia (40%;  $P > 0.05$ ) para embriones criopreservados por CL y Vit. Este resultado coincide con la tasa de gestación pos-transferencia reportada en otros estudios, que va de 35 a 55% y 35 a 65% para embriones criopreservados por CL y Vit, respectivamente (Youngs, 2011). La tasa de gestación reportada por Zárate *et al.* (2018) con embriones criopreservados por CL fue

similar a la obtenida en este estudio (44 %), pero con embriones Vit la tasa de gestación fue inferior (20%). El éxito de la TE depende de diferentes factores, tanto de la receptora como del desarrollo y calidad del embrión, método de criopreservación, la sincronización de la ovulación y el técnico que hace la transferencia.

## **CONCLUSIONES E IMPLICACIONES**

Los embriones bovinos producidos *in vivo* y criopreservados por CL y Vit produjeron tasa de gestación similar, misma que coincidió con los rangos reportados a nivel internacional. Por lo tanto, la aplicación de cualquiera de estas técnicas para criopreservar embriones bovinos producidos *in vivo* es viable.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Garcia, JAE, et al. (2018). Evaluación del impacto en la productividad y rentabilidad de la tecnología transferida al sistema de doble propósito del trópico mexicano. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 21,261-272.

Youngs, CR. (2001). Cryopreservation of preimplantation embryo of cattle, sheep, and goats. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (54).

Zarate, GOE, et al. (2018). Transferencia de embriones bovinos criopreservados: Efecto de la blastocentesis. *Agrociencia*, 52(1), 21-32.

## **RECONOCIMIENTOS**

Al Sr. Timoteo Aguirre Cruz, dueño del Rancho Acapulco, y su hijo el MC. Vicente Eduardo Aguirre Barradas, por el financiamiento y facilidades para realizar el estudio. Al proyecto 18547 “Servicios en reproducción animal” de la FMVZ, UV, por aportar parte del financiamiento para el estudio.

**Palabras clave:** Biotecnologías, doble propósito, ovulación múltiple

## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

### 1. DISCUSIÓN GENERAL

La OM y la TE son biotecnologías reproductivas ampliamente utilizadas en todo el mundo para la obtención de un mayor número de crías genéticamente superiores que mejoren los hatos ganaderos y que contribuyan al aumento de la producción de carne y leche (Machaty *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Marinone *et al.*, 2015). A nivel mundial se producen anualmente más de 600 000 embriones bovinos in vivo (tanto de ganado lechero como cárnico) a partir de donadoras inducidas a OM (IETS, 2017).

Para maximizar la producción de embriones *in vivo* generalmente se utilizan tratamientos de OM que contemplan la aplicación de FSH dos veces al día en dosis decreciente durante cuatro a cinco días, para inducir el crecimiento folicular múltiple (Kimura *et al.*, 2007). Además, para reducir la mano de obra necesaria para aplicar dichos tratamientos, se ha utilizado eCG, que tiene actividad tanto de FSH como de LH (Murphy y Martinuk, 1991; Bó *et al.*, 2018). Existen tratamientos que combinan FSH y eCG, con los que se obtienen resultados similares a los reportados con tratamientos que utilizan FSH en múltiples aplicaciones (Callejas *et al.*, 2002; Callejas *et al.*, 2005).

La respuesta a la inducción de OM depende de diferentes factores como raza, edad, estado general del animal (salud, nutrición y manejo), tipo de hormona, forma de aplicación, clima y medio ambiente (Mapletoft *et al.*, 2002; Hizli *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2014); sin embargo, la respuesta ovárica de cada hembra está relacionada con el número de folículos sensibles a las gonadotropinas en el momento en que se inician los tratamientos, haciéndola muy variable entre individuos y difícil de predecir (Gasser *et al.*, 2006; Mossa *et al.*, 2007; Hussein *et al.*, 2014).

Uno de los factores que influye en la respuesta a la OM es la edad de las donadoras, asociada a alteraciones en la secreción de gonadotropinas y hormonas ováricas (Bryner *et al.*, 1990). En donadoras mayores de 8 años de edad, se ha reportado menor producción de embriones, lo que no se atribuye a una disminución de la tasa ovulatoria, sino a disminución de la tasa de fertilidad, la regularidad de los ciclos estruales y calidad de los embriones (Donaldson, 1984; Bryner *et al.*, 1990; Malhi *et al.*, 2005).

La menor producción de embriones en vacas de edad avanzada sometidas a tratamientos de OM, puede estar relacionada con la capacidad de respuesta de los folículos ováricos hacia las gonadotropinas, y con cambios endocrinos que ocurren a medida que la edad aumenta (Malhi *et al.*, 2005). Aunque el patrón de ondas foliculares es similar al de vacas jóvenes, las vacas viejas tienen menos folículos ováricos reclutados en una onda folicular, lo que conlleva a tener menos folículos preovulatorios después del tratamiento de OM (Silva *et al.*, 2009). El menor número de folículos reclutados en vacas viejas, a pesar de la elevada concentración de FSH por el tratamiento de inducción de OM, puede ser el resultado de menos receptores de gonadotropina en las células de la granulosa, deterioro de la unión de la hormona con el receptor, baja capacidad de respuesta de la célula de la granulosa después de la unión de la hormona con su receptor o cambios intrínsecos del factor de crecimiento del folículo ovárico (Bryner *et al.*, 1990; Malhi *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que el número de ovocitos se limita en hembras con más de 9 años de edad, así como su capacidad de ser fertilizados (Breuel *et al.*, 1991; Hasler, 2003; Yamamoto *et al.*, 2010). Por su parte, en donadoras jóvenes (de 1 a 3 años) se obtiene mayor porcentaje de blastocistos en comparación con hembras de mayor edad (>12 años) (Su *et al.*, 2012; Villaseñor *et al.*, 2017). En esta investigación se observó que las donadoras de 8 años o mayores produjeron de uno a tres embriones viables, a diferencia de donadoras más jóvenes que produjeron de cuatro a siete embriones viables. Este resultado es similar al reportado por Villaseñor *et al.* (2017), donde utilizaron 12 donadoras Criollo Coreño (*Bos taurus*) de edades entre 9 y 17 años, que produjeron en promedio dos embriones transferibles; sin embargo, obtuvieron el mismo promedio de embriones viables para vaquillas de 3 años de edad, debido a que hembras jóvenes pueden presentar fallas endocrinas por las grandes cantidades de estradiol circulante, lo que provoca una baja respuesta a la inducción a la OM (Lerner *et al.*, 1986).

En esta investigación algunas donadoras de edad avanzada no produjeron ningún embrión, lo que coincide con los reportes de que entre 20 y 30 % de las donadoras bovinas sometidas a tratamientos de OM no responden al mismo y por ende, no producen embriones (Hossein, 2010; Bó y Mapletoft, 2014; Biancucci *et al.*, 2016), aunque esto es independiente de la edad de la donadora.

La función de la FSH está mediada por el receptor de FSH (FSHR) que se expresa en las células de la granulosa del folículo ovárico (Fan y Hendrickson, 2005). Sin embargo, se ha demostrado que las mutaciones en el gen de FSHR podrían afectar la capacidad reproductiva (Livshyts *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Sharifiyazdi *et al.*, 2018). En humanos, el genotipo FSHR es determinante en la capacidad de la respuesta ovárica a la FSH (Mayorga *et al.*, 2005). Así, los polimorfismos de un solo nucleótido podrían convertirse en los factores predictivos de la respuesta ovárica, por lo que el conocimiento del genotipo FSHR podría permitir determinar la dosis más adecuada de FSH para la OM en el ganado bovino (Fauser *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010; Sharifiyazdi *et al.*, 2018).

Yang *et al.* (2010) propusieron el gen FSHR como un marcador molecular adecuado, debido a sus efectos en las variables de OM, informando una asociación significativa entre la mutación A/G localizada en la posición -278 del gen FSHR y la variación en la respuesta de la OM en ganado lechero en China. Al respecto, Hernandez-Cruz *et al.* (2009) demostraron la existencia de variaciones alélicas en el gen FSHR (polimorfismo) en hembras bovinas, lo que puede estar influyendo en la respuesta a los tratamientos de OM que se utilizan en el ganado bovino.

Existen diferentes factores como la raza y edad del animal, así como el tipo y dosis de gonadotropina utilizada, y el personal que aplica los protocolos de OM, que limitan el éxito de estos últimos en el ganado bovino, afectando los programas de mejoramiento genético (Bó *et al.*, 2008). Sin embargo, el principal factor que limita el éxito de estos programas sigue siendo la alta variabilidad en la respuesta a la OM (Hasler, 2014; Bó *et al.*, 2018).

En los últimos años se han realizado estudios enfocados en nuevos protocolos de OM que requieran menor manejo de la donadora, sin que se afecte la viabilidad, el número y la calidad de los embriones obtenidos (Carvalho *et al.*, 2014; Bó *et al.*, 2018), buscando inclusive reducir el estrés asociado al manejo en la donadora (Tríbulo *et al.*, 2012).

Los tratamientos de OM tradicionales consisten en la aplicación única de eCG o la múltiple dos veces al día de FSH por 4 o 5 días (Mapletoft *et al.*, 2002); éstos últimos tienen mayor probabilidad de no ser exitosos debido a fallas en la aplicación repetida de la FSH (Bó *et al.*, 2018). Actualmente, los tratamientos de OM utilizan con mayor frecuencia FSH en lugar de eCG, debido a que esta hormona contiene más carbohidrato (ácido siálico) (Hafez y Hafez, 2000), lo que la hace tener una vida media de 4 a 6 días (Shabankareh *et al.*, 2012),



que resulta en una estimulación prolongada del crecimiento folicular y problemas endocrinos (Kimura *et al.*, 2007; Mikkola y Taponen, 2017). Estudios endocrinos revelaron que animales sometidos a tratamientos de OM con eCG, resultan con perfiles anormales de LH y progesterona, asociado a una estimulación ovárica continua, reducción de la ovulación, baja tasa de fertilización y baja calidad embrionaria (Jensen *et al.*, 1982; Bó y Mapletoft, 2014; Bó *et al.*, 2018).

Con respecto a la TE, en el 2016 a nivel mundial se transfirieron 516 585 embriones producidos in vivo, de los cuales 195 563 fueron transferidos en fresco y 321 022 fueron transferidos posterior a su criopreservación (IETS, 2017). La transferencia de embriones de buena calidad (blastocistos y mórulas calidad 1), dará como resultado altas tasas de gestación, siempre y cuando se transfieran a receptoras adecuadas (Bó y Mapletoft, 2018). Por otro lado, la obtención de tasas de gestación muy bajas después de la TE puede deberse a diversos factores, como la asincronía de la edad del embrión con la receptora, la estación del año (transferencias en primavera-verano con temperaturas altas), la presencia de celo (que asegure la ovulación, para tener un cuerpo lúteo adecuado para transferencia), el manejo general de la receptora (nutrición, salud y manejo dentro de la granja) y la destreza de quien realiza la transferencia (Stroud y Hasler, 2006; Hasler, 2014).

Se estima que más del 50 % de la población ganadera mundial se encuentra en zonas tropicales, donde el estrés calórico (por las altas temperaturas y humedad) causan grandes pérdidas económicas en el ganado (Wolfenson *et al.*, 2000; Sartori *et al.*, 2010). Estudios de TE han analizado cómo el estrés calórico disminuye la viabilidad de esta biotecnología, incrementando la incidencia de muerte embrionaria (Hernández *et al.*, 2004; Hansen, 2007). Las hembras receptoras constituyen un aspecto muy importante para el éxito de la TE. Se han desarrollado protocolos capaces de sincronizar la ovulación para poder realizar la TE a tiempo fijo, en donde se elimina la necesidad de detectar el estro (Butler *et al.*, 2011). La presencia de un cuerpo lúteo al momento de realizar la transferencia del embrión juega un papel importante en los resultados de la tasa de gestación, porque se espera que sea capaz de secretar suficiente progesterona para mantener la gestación (Oyuela y Jiménez, 2010). De acuerdo con Bó *et al.* (2004), el uso de eCG en los protocolos de sincronización, incrementa el número de receptoras adecuadas para su transferencia, debido a que presentan un cuerpo lúteo >18 mm de diámetro, asegurando la producción de progesterona para

mantener la preñez y obtener buenas tasas de gestación. En el presente estudio, el protocolo de sincronización para realizar TE incluyó eCG, resultando en 80 % (105/130) del total de receptoras con un cuerpo lúteo óptimo para la TE. Al respecto, Zárate *et al.* (2018) reportó 89 % de receptoras sincronizadas con un cuerpo lúteo óptimo para la TE, utilizando el mismo protocolo de sincronización y en condiciones similares a este estudio.

El manejo nutricional de las receptoras es muy importante para establecer y mantener la gestación, principalmente en los primeros 45 días después de la transferencia, ya que el déficit de energía puede llevar a obtener bajas tasas de gestación (Stroud y Hasler, 2006; Hasler, 2014). Las receptoras de este estudio estuvieron en un sistema semi-estabulado con pastoreo rotacional cada tres semanas, así como la suplementación diaria con 2 kg de alimento concentrado con 20 % de proteína cruda por 45 días antes de la transferencia y 90 post-transferencia, lo que les permitió mantener una buena condición corporal.

Con respecto a los métodos de criopreservación de embriones bovinos, las tasas de gestación obtenida con embriones criopreservados por CL y VT en el presente estudio fue para ambos del 40 %, estando dentro del rango que se reporta a nivel mundial que va de 35 a 55 % para embriones criopreservados por CL (Chase *et al.*, 2009; Ledezma *et al.*, 2011) y de 35 a 65 % para embriones vitrificados (Cabrera *et al.*, 2006; Youngs, 2011; Hasler, 2014). Los resultados de este estudio son similares a lo reportado por Bényei *et al.* (2006) (41 %) para embriones criopreservados por CL en condiciones tropicales de Brasil, indicando que, en condiciones tropicales, los factores externos tienen una influencia en los resultados de la tasa de gestación post-transferencia. La tasa de gestación con embriones criopreservados por vitrificación es 10 % menor a la que se obtiene cuando se transfieren embriones en fresco (70 %) (Hasler, 2014), debido a que se utiliza una alta concentración de crioprotectores que impiden la formación de cristales de hielo en el embrión (An *et al.*, 2015), siendo una alternativa para criopreservar los embriones con tasas de gestación aceptables.

Las tasas de gestación obtenidas en este estudio fueron superiores a las reportadas por Naranjo *et al.* (2016) en Veracruz, de 10 y 20 % para embriones criopreservados por CL y VT, respectivamente, y quienes atribuyeron este pobre resultado al mal manejo de las receptoras, a la época del año en la que se hicieron las transferencias (verano, cuando las temperaturas son altas) y a la baja condición corporal de las vacas debido a la lactancia.

Zárate *et al.* (2018) transfirieron embriones criopreservados por CL y VT en similares condiciones climáticas y genotípicas (cruza de *Bos indicus* x *Bos taurus*) a las del presente estudio, y utilizando el mismo protocolo de sincronización de la ovulación, y obtuvieron tasas de gestación de 8 y 64 % para embriones criopreservados por CL y VT respectivamente, atribuyendo los resultados a que los embriones bovinos vitrificados tienen mayor viabilidad y por tanto mayor tasa de gestación que aquéllos que son preservados por CL.

El uso de la OM y la TE en hatos ganaderos que se encuentran en zonas tropicales va en aumento, y con este tipo de investigaciones se incorporan importantes avances para la aplicación de estas biotecnologías reproductivas en los bovinos, al promover la obtención de individuos de alto valor genético que contribuyan a la mejora de los hatos y en consecuencia a satisfacer las necesidades futuras de alimento. Con esta investigación se obtuvo información que permitirá hacer una mejor selección de las donadoras, y se demostró que es posible reducir el manejo de las donadoras durante los tratamientos de OM sin afectar la cantidad y calidad de embriones producidos.

## **2. CONCLUSIONES GENERALES**

Las hembras donadoras de edad avanzada sí responden a los tratamientos de OM, pero el promedio de embriones viables recuperados es bajo, por lo que se debe evitar incluir donadoras de más de 8 años de edad en programas de OM.

El protocolo de OM empleado en este estudio en el que se sustituyeron las últimas cuatro dosis de FSH por una sola dosis de eCG, es una alternativa para producir embriones en donadoras *Bos taurus* x *Bos indicus*, reduciendo al mismo tiempo las veces en que éstas deben ser manejadas.

Los embriones bovinos producidos *in vivo* pueden ser criopreservados por congelación lenta o vitrificación, obteniéndose tasas de gestación similares después de su transferencia.

### 3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An, L., Chang, S., Hu, Y., Li, Y., Xu, B., Zhang, F., . . . Du, F. (2015). Efficient cryopreservation of mouse embryos by modified droplet vitrification (MDV). *Cryobiology*, 71(1), 70-76.
- Bényei, B., Komlósi, I., Pécsi, A., Pollott, G., Marcos, C. H., de Oliveira Campos, A., & Lemes, M. P. (2006). The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. *Animal reproduction science*, 93(3), 268-279. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.012>
- Biancucci, A., Sbaragli, T., Comin, A., Sylla, L., Monaci, M., Peric, T., & Stradaoli, G. (2016). Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: ¿Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol? *Theriogenology*, 85(5), 914-921. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.041>
- Bó, G., Guerrero, D., & Adams, G. (2008). Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*, 69(1), 81-87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.005>
- Bó, G., & Mapletoft, R. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81(1), 38-48. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>
- Bó, G., & Mapletoft, R. (2018). Embryo Transfer Technology in Cattle. In H. Niemann & C. Wrenzycki (Eds.), *Animal Biotechnology 1: Reproductive Biotechnologies* (pp. 107-133). Cham: Springer International Publishing.
- Bó, G., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R. J., & Tribulo, H. (2004). Transferencia de embriones a tiempo fijo: tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. *Taurus*, 21, 25-40.
- Bó, G., Rogan, D., & Mapletoft, R. (2018). Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. *Theriogenology*, 112, 26-33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.034>
- Breuel, K., Baker, R., Butcher, R., Townsend, E., Inskeep, E., Dailey, R., & Lerner, S. (1991). Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*, 36(2), 241-255.
- Bryner, R. W., Garcia-Winder, M., Lewis, P. E., Inskeep, E. K., & Butcher, R. L. (1990). Changes in hormonal profiles during the estrous cycle in old lactating beef cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 7(2), 181-189. doi: [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(90\)90024-T](https://doi.org/10.1016/0739-7240(90)90024-T)
- Butler, S., Phillips, N., Boe-Hansen, G., Bo, G., Burns, B. M., Dawson, K., & McGowan, M. (2011). Ovarian responses in *Bos indicus* heifers treated to synchronise ovulation with intravaginal progesterone releasing devices, oestradiol benzoate, prostaglandin F2 $\alpha$  and equine chorionic gonadotrophin. *Animal reproduction science*, 129(3-4), 118-126.
- Cabrera, P., Fernández, A., Bastidas, P., Molina, M., Bethencourt, A., & Díaz, T. (2006). Vitrificación: una alternativa para la criopreservación de embriones. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*, 47(1).

- Callejas, S., Alberio, R., Cabodevila, J., Dulout, F., Aller, J., & Catalano, R. (2005). El uso combinado de dosis reducidas de FSH-P y de eCG como tratamiento superovulatorio en bovinos. *Revista Argentina de Producción Animal*, 25(1-2), 63-73.
- Callejas, S., Alberio, R., Cabodevila, J., Dulout, F., Aller, J., & Teruel, M. (2002). Efecto de la estimulación ovárica con FSH-P en dosis única disuelta en polivinilpirrolidona y la combinación de FSH-P y eCG en dosis reducidas. *Rev. Arg. Prod. Anim*, 22, 141-151.
- Carvalho, P., Hackbart, K., Bender, R., Baez, G., Dresch, A., Guenther, J., . . . Fricke, P. (2014). Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: A preliminary study. *Theriogenology*, 82(3), 481-489. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.011>
- Chase, C., Vargas, C., Hammond, A., Olson, T., Griffin, J., Murphy, C., . . . Fields, M. (2009). Embryo transfer in angus and brahman recipient cows: Effect of two methods of estrus synchronization on induced estrus and pregnancy. *Revista científica*, 19(6), 630-638.
- Donaldson, L. E. (1984). Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology*, 21(6), 1013-1018.
- Fan, Q. R., & Hendrickson, W. A. (2005). Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*, 433(7023), 269.
- Fausser, B., Diedrich, K., & Devroey, P. (2007). Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Human reproduction update*, 14(1), 1-14.
- Gasser, C., Burke, C., Mussard, M., Behlke, E., Grum, D., Kinder, J., & Day, M. (2006). Induction of precocious puberty in heifers II: Advanced ovarian follicular development. *Journal of animal science*, 84(8), 2042-2049.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2000). *Reproducción e Inseminación Artificial en animales* (M.-H. I. Editores Ed. Cuarta edición ed.).
- Hansen, P. (2007). Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*, 68, S242-S249.
- Hasler, J. (2003). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal reproduction science*, 79(3-4), 245-264.
- Hasler, J. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81(1), 152-169. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>
- Hernandez-Cruz, B., Cervantes-Acosta, P., Montiel-Palacios, F., Canseco-Sedano, R., & Carrasco-García, A. (2009). Allelic variants of FSHR gene in cows of different genotypes in Mexico. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(12), 2489-2494.
- Hernández, C. J., Chase, C. C., & Hansen, P. J. (2004). Differences in Heat Tolerance Between Preimplantation Embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds\*. *Journal of dairy science*, 87(1), 53-58. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73141-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73141-0)
- Hizli, H., Ayaşan, T., Gök, K., Kara, U., Kiliçalp, N., Çamlıdağ, A., . . . Asarkaya, A. (2011). The determination of relationship between age and the quality of embryo of donor cows. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(3), 493-497.

- Hossein, Z. (2010). Evaluation of the genetic trend of milk yield in the multiple ovulation and embryo transfer populations of dairy cows, using stochastic simulation. *Comptes Rendus Biologies*, 333(10), 710-715. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2010.07.001>
- Hussein, M., Aziz, R. A., Abdel-Wahab, A., & El-Said, H. (2014). Preliminary study of factors affecting the superovulatory response of high producing dairy cows superstimulated regardless of the stage of estrous cycle in Egypt. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 286-292. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2014.11.002>
- IETS. (2017). 2016 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals.
- Jensen, A. M., Greve, T., Madej, A., & Edqvist, L. E. (1982). Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2 $\alpha$  treated cow. *Theriogenology*, 18(1), 33-44. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(82\)90046-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(82)90046-2)
- Kimura, K., Hirako, M., Iwata, H., Aoki, M., Kawaguchi, M., & Seki, M. (2007). Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology*, 68(4), 633-639. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.02.016>
- Ledezma, R., Camacho, M., Picón, F., Moreno, G., & Zárata, J. (2011). Efecto del CIDR aplicado en vacas de carne receptoras para transferencia de embriones sobre la tasa de preñez. *CiENCiAUANL*, 14(3), 281-287.
- Lerner, S. P., Thayne, W. V., Baker, R. D., Henschen, T., Meredith, S., Inskip, E. K., . . . Butcher, R. L. (1986). Age, Dose of FSH and Other Factors Affecting Superovulation in Holstein Cows. *Journal of animal science*, 63(1), 176-183. doi: [10.2527/jas1986.631176x](https://doi.org/10.2527/jas1986.631176x)
- Livshyts, G., Podlesnaja, S., Kravchenko, S., Sudoma, I., & Livshits, L. (2009). A distribution of two SNPs in exon 10 of the FSHR gene among the women with a diminished ovarian reserve in Ukraine. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 26(1), 29.
- Machaty, Z., Peippo, J., & Peter, A. (2012). Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. *Theriogenology*, 78(5), 937-950. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.003>
- Malhi, P. S., Adams, G. P., & Singh, J. (2005). Bovine Model for the Study of Reproductive Aging in Women: Follicular, Luteal, and Endocrine Characteristics1. *Biology of reproduction*, 73(1), 45-53. doi: [10.1095/biolreprod.104.038745](https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.038745)
- Mapletoft, R., Steward, K., & Adams, G. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 42(6), 601-611.
- Marinone, A. I., Losinno, L., Fumuso, E., Rodríguez, E. M., Redolatti, C., Cantatore, S., & Cuervo-Arango, J. (2015). The effect of mare's age on multiple ovulation rate, embryo recovery, post-transfer pregnancy rate, and interovulatory interval in a commercial embryo transfer program in Argentina. *Animal reproduction science*, 158, 53-59. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.04.007>
- Mayorga, M. P., Gromoll, J. r., Behre, H. M., Gassner, C., Nieschlag, E., & Simoni, M. (2005). Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(9), 3365-3369.

- Mikkola, M., & Taponen, J. (2017). Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. *Theriogenology*, 88, 84-88. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.052>
- Mossa, F., Duffy, P., Naitana, S., Lonergan, P., & Evans, A. (2007). Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes. *Animal reproduction science*, 100(3-4), 391-396.
- Murphy, B. D., & Martinuk, S. D. (1991). Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12(1), 27-44.
- Naranjo, C., Becerril, P., Canseco, S., Zárate, G., Soto, E., Rosales, M., & Rosendo, P. (2016). Comparación de dos métodos de transferencia de embriones en el ganado criollo lechero tropical. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 3(7), 113-120.
- Oyuela, L., & Jiménez, C. (2010). Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 57(III), 191-200.
- Sartori, R., Bastos, M. R., Baruselli, P. S., Gimenes, L. U., Ereno, R. L., & Barros, C. M. (2010). Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. Nottingham.
- Shabankareh, H. K., Seyedhashemi, S. B., Torki, M., Kelidari, H., & Abdolmohammadi, A. (2012). Effects of repeated administration of hCG on follicular and luteal characteristics and serum progesterone concentrations in eCG-superovulated Sanjabi ewes. *Tropical animal health and production*, 44(8), 1865-1871. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-012-0149-6>
- Sharifiyazdi, H., Mirzaei, A., & Ghanaatian, Z. (2018). Characterization of polymorphism in the FSH receptor gene and its impact on some reproductive indices in dairy cows. *Animal reproduction science*, 188, 45-50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.11.006>
- Silva, J., Alvarez, R., Zanenga, C., & Pereira, G. (2009). Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle. *Anim. Reprod*, 6(3), 440-445.
- Stroud, B., & Hasler, J. F. (2006). Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology*, 65(1), 65-76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.007>
- Su, L., Yang, S., He, X., Li, X., Ma, J., Wang, Y., . . . Ji, W. (2012). Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up. *Reproduction in domestic animals*, 47(2), 184-189.
- Tríbulo, A., Rogan, D., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Mapletoft, R. J., & Bó, G. A. (2012). Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*, 77(8), 1679-1685. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.013>
- Villaseñor, G., Sánchez, T., Martínez, V., Álvarez, G., Pérez, R., Palacios, F., . . . Montaña, B. (2017). Caracterización de la respuesta ovárica a la superovulación en bovino Criollo Coreño utilizando dosis reducidas de FSH. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 8(3), 225-232. doi: <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i3.4498>
- Wolfenson, D., Roth, Z., & Meidan, R. (2000). Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal reproduction science*, 60-61, 535-547. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00102-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00102-0)
- Yamamoto, T., Iwata, H., Goto, H., Shiratuki, S., Tanaka, H., Monji, Y., & Kuwayama, T. (2010). Effect of maternal age on the developmental competence and progression of

- nuclear maturation in bovine oocytes. *Molecular reproduction and development*, 77(7), 595-604.
- Yang, W.-C., Li, S.-J., Tang, K.-Q., Hua, G.-H., Zhang, C.-Y., Yu, J.-N., . . . Yang, L.-G. (2010). Polymorphisms in the 5' upstream region of the FSH receptor gene, and their association with superovulation traits in Chinese Holstein cows. *Animal reproduction science*, 119(3-4), 172-177. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.02.004>
- Yang, W.-C., Yang, L.-G., Riaz, H., Tang, K.-Q., Chen, L., & Li, S.-J. (2013). Effects in cattle of genetic variation within the IGF1R gene on the superovulation performance and pregnancy rates after embryo transfer. *Animal reproduction science*, 143(1), 24-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.10.008>
- Youngs, C. R. (2011). Cryopreservation of preimplantation embryos of cattle, sheep, and goats. *Journal of visualized experiments: JoVE*(54).
- Zárate, G., Prado, J., Canseco, S., Palacios, F., & García, A. (2018). Transferencia de embriones bovinos criopreservados: Efecto de la blastocentesis. *Agrociencia*, 52(1), 21-32.