

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA
DIVISION REGIONAL CIENCIA ANIMAL**



**Producción *in vitro* de embriones en invierno y verano en vacas Holstein
Friesian en la Comarca Lagunera.**

TESIS

POR:

JOE PEÑA HILARIO

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO

DICIEMBRE 2018.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Producción *in vitro* de embriones en invierno y verano en vacas Holstein Friesian en la Comarca Lagunera.

Por:

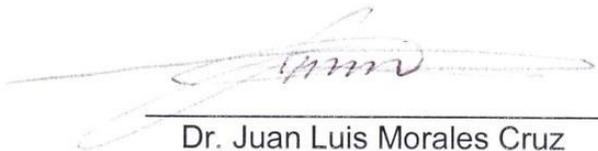
JOE PEÑA HILARIO

TESIS

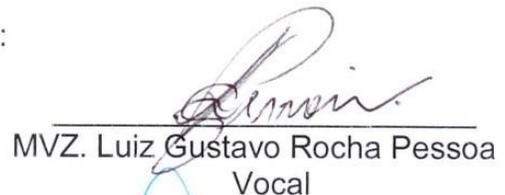
Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

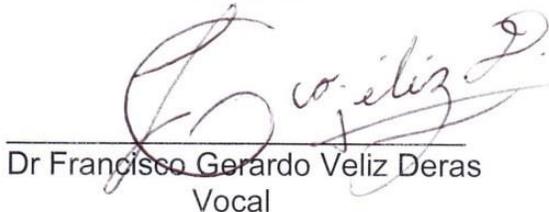
Aprobada por:



Dr. Juan Luis Morales Cruz
Presidente



MVZ. Luiz Gustavo Rocha Pessoa
Vocal



Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras
Vocal



MC. Gerardo Arellano Rodríguez
Vocal Suplente



MVZ. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Diciembre 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Producción *in vitro* de embriones en invierno y verano en vacas Holstein Friesian en la Comarca Lagunera.

Por:

JOE PEÑA HILARIO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

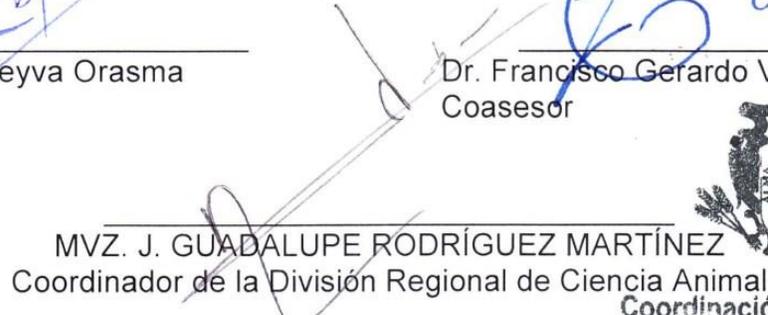
Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Juan Luis Morales Cruz
Asesor Principal Interno


MVZ. Luiz Gustavo Rocha Pessoa
Asesor Principal Externo


Dr. Carlos Leyva Orasma
Coasesor


Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras
Coasesor


MVZ. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Diciembre 2018

AGRADECIMIENTO.

Solo Dios sabe cuánto doy gracias por guiar mis pasos hasta donde he llegado, le doy gracias por cada día de mi vida y las personas que ha puesto en el camino para que hoy pueda hacer un sueño de toda una vida, realidad; familia, amigos y por supuesto este inmenso gusto de encaminar mi vida por estos hermosos animales que es el ganado bovino.

A mis padres el Sr. Adán Peña Aguilar y la Sra. Justina Hilario Pérez por haberme guiado por este camino, apoyarme incondicionalmente y permitirme ser un profesionalista. En especial a mi madre ante todo porque a pesar de la situación que paso, siempre me apoyo desde el principio a encaminar esta idea, guiándome, enseñándome y acompañando cada paso y decisión sin ninguna condición. Gracias por todo su amor y cariño.

A mis hermanos y familiares por apoyarme y darme su cariño gracias los quiero mucho.

A mis tías. Las cuales me apoyaron en momentos claves en especial a mi tía Judith Hilario Pérez ya que sin su apoyo incondicional no hubiera podido lograr mi sueño de ser profesionalista, estaré agradecido con ustedes toda la vida muchas gracias.

A los docentes M.V.Z. DR. Carlos Leyva y en especial al DR. Juan Luis Morales Cruz, por su amistad, por confiar en mí y ayudarme a que este proyecto se hiciera realidad. Gracias.

DEDICATORIA.

Mi trabajo de investigación se lo dedico principalmente a mi novia Alicia Sarahi Montañó Ramírez a quien amo con todo mi corazón, es ella quien me ha ayudado a salir adelante, quien ayuda a enfocarme en mis sueños y se hagan realidad; estoy muy agradecido con ella ya que me ha demostrado que con ayuda de Dios se puede salir adelante.

Este trabajo también se lo dedico a una persona a quien yo amo y admiro mucho, es para mi querida madre la Sra. Justina Hilario Pérez. Gracias por todo ese amor, apoyo y confianza que dio, gracias por demostrarme que salir adelante es posible sin importar las adversidades que se nos presentan, vencer los obstáculos y demostrarme a no decirle a Dios que tan grande son los problemas, si no decirles a los problemas que tan grande es Dios.

Para ese gran hombre que a pesar de todo admiro mucho por enseñarme buenos modales y su forma de luchar para sacar adelante a su familia mi señor padre Adán Peña Aguilar por todo su apoyo, comprensión y amor. Gracias queridos Padres.

RESUMEN

“Producción *in vitro* de embriones en invierno y verano en vacas Holstein Friesian en la Comarca Lagunera”

En éste trabajo se evaluó la producción ovocitaria y de embriones *in vitro* en dos épocas del año en vacas Holstein Friesian, teniendo como hipótesis que es mayor la producción de ambas variables en invierno que en verano.

Se tomaron en cuenta dos grupos experimentales de vacas, las donadoras de la época de invierno y las donadoras de la época de verano, mediante aspiración folicular conjunto la técnica de Fertilización *in vitro*, se analizaron tanto el total de ovocitos colectados así como los ovocitos viables, también se evaluaron los ovocitos cultivados y los embriones producidos a término; se demostró que la producción ovocitaria y de embriones *in vitro* en vacas Holstein Friesian es mayor en invierno que en verano.

PALABRAS CLAVE: *In Vitro*, Embriones, Ovocitaria, Estrés Calórico, Verano, Invierno, Comarca Lagunera.

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTO	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
INTRODUCCIÓN	1
1.1 HIPÓTESIS	3
1.2 OBJETIVO	3
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2.- REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Ciclo estral y dinámica folicular	4
2.1.1 Control neurológico y endocrinológico del ciclo estral	6
2.1.2 Hipotálamo	6
2.1.3 Hipófisis	7
2.1.4 Fases del ciclo estral	7
2.1.6 Fase Periovulatoria (estro – metaestro)	7
2.1.7 Fase Lúteal o Diestro	9
2.1.8 Dinámica folicular	9
2.1.9 Reclutamiento	9
2.1.10 Selección	9
2.1.11 Dominancia	10
2.1.12 Ovarios	10
2.1.13 Hormonas ováricas	10
2.1.14 Útero	11
2.2 Importancia de la calidad ovocitaria en la producción de embriones	12
2.2.1 Métodos para la obtención de ovocitos	12
2.2.2 Obtención de ovocitos post mortem	12
2.2.3 Aspiración folicular (OPU)	12
2.2.4 Seccionamiento de ovario	13
2.2.5 Obtención de ovocitos in vivo	13

2.2.6 Recolección de ovocitos por medio de laparoscopia .	14
2.2.7 Factores que afectan la calidad del ovocito.....	14
2.2.7.1 Edad del animal	14
2.2.7.2 Categoría de los animales.	15
2.2.7.3 Condición nutricional.	15
2.2.7.4 Tamaño de ovarios.	15
2.2.7.5 Enfermedades intrauterinas	15
2.2.7.6 Evaluación de la calidad de del ovocito.	16
2.3 Importancia del estrés calórico en la producción de embriones.	17
2.3.1 Fisiopatología del estrés calórico.	18
2.3.2 Efectos del estrés sobre la reproducción en bovinos.	19
2.3.3 El efecto del estrés calórico sobre los gametos y embriones.	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Descripción del área de estudio.....	23
3.2 Animales experimentales.	24
3.3 Las vacas al momento del experimento tuvieron:.....	25
3.4 Sistema de manejo	27
3.5 Alimentación.	28
3.6 Materiales a utilizar.	29
3.6.1 Equipo de aspiración folicular.	29
3.6.2 Proceso de aspiración folicular.	30
3.6.3 Proceso de producción in vitro.	31
3.6.3.1 Separación espermática	32
3.6.3.2 Procedimiento de preparación del Percoll.....	32
3.6.3.3 Conteo espermático	32
3.6.3.4 Fertilización de ovocitos.	33
3.6.4 Variables a analizar	33
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
5.- RESULTADOS	35
6.- DISCUSIÓN.....	39

7.- CONCLUSIONES	43
8.- BILIOGRAFIA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema de hormonas del ciclo estral.	8
FIGURA 2. Clasificación morfológica de los ovocitos.	17
FIGURA 3. Localización del área de estudio, Torreón, Coahuila, México.	24
FIGURA 4. Vacas altas productoras donadoras ovocitos.	27
FIGURA 5. Corral de aspiración folicular.	28
FIGURA 6. Ración totalmente mezclada (RMT) de establo lechero en condiciones intensivas.	29
FIGURA 7. Equipo utilizado en aspiración folicular in vivo.	31
FIGURA 8. Total de ovocitos colectados en dos épocas en vacas Holstein Friesian.	35
FIGURA 9. Total de ovocitos viables en dos épocas en vacas Holstein Friesian.	36
FIGURA 10. Total de ovocitos cultivados en dos épocas en vacas Holstein Friesian.	37
FIGURA 11. Total, de embriones producidos en dos épocas en vacas Holstein Friesian.	38

INTRODUCCIÓN

La ganadería, y en especial lo relacionado con la industria lechera, ha sido líder de la producción animal al aprovechar los frutos de las nuevas técnicas biotecnológicas, lo que contribuirá indudablemente en los próximos años, a lograr un aumento de la producción de leche y carne. El objetivo de utilizar biotecnologías en el área de la reproducción animal está dirigido a intensificar el mejoramiento y la multiplicación de razas e individuos de calidad genética superiores, que conlleve a un incremento en el progreso genético de la especie o raza en cuestión (Sanz y Martínez, 2010).

Existe un amplio número de biotecnologías que se usan en cada uno de los tres sectores principales de la zootecnia que se ubican como: reproducción que cubre genética y mejoramiento; nutrición y la producción que cubre sanidad animal y bienestar animal. La biotecnología de la reproducción comprende técnicas como: inseminación artificial y preservación de semen, usadas para el mejoramiento genético del ganado; sexado de espermatozoides, súper ovulación, transferencia de embriones, aspiración folicular, producción de embriones *in vitro* y clonación, usadas para mejorar la eficiencia reproductiva y la tasa de reproducción (Madan, 2005). La fertilización *in vitro* (FIV) se ha realizado con varias especies de animales domésticos, ésta técnica se ha desarrollado a lo largo de varios años por lo cual cada vez ha ido mejorando; la técnica de FIV está basada en la maduración artificial de huevos no fecundados (oocitos) que generalmente provienen de vacas de alto valor genético o de los ovarios de vacas sacrificadas en mataderos, los que posteriormente son fecundados con espermatozoides crio preservados (Reyes, 1995).

La FIV a gran nivel representa el primer paso hacia nuevas biotecnologías. Los embriones producidos pueden ser mantenidos en frío (criopreservación) y luego transferirse a vacas receptoras sincronizadas hormonalmente, igual que en la transferencia de embriones tradicional; también, los embriones pueden ser sometidos a procedimientos como micromanipulación de las células embrionarias

en etapa temprana (blastómeros), clonarse o someterse a efectos de ingeniería genética (Reyes, 1995).

Gracias a la aplicación de la tecnología de Aspiración Folicular OPU y Fecundación *In Vitro* a nivel comercial en México, hoy se cuenta con una de las tecnologías de vanguardia que posibilitan la obtención de gran cantidad de embriones procedentes de donadoras con un alto valor genético, abriendo posibilidades para su implementación dentro del programa de repoblamiento bovino con mejor valor genético (Chen, 2001).

Una etapa crítica en el procedimiento de *fertilización in vitro* es la elección de ovocitos de buena calidad para poder garantizar un óptimo desarrollo, los aspectos más importantes que evalúan la calidad del ovocito son: estado nuclear, características citoplasmáticas, aspectos de la corona radiada y la expansión o distribución de las células del cumulus, la calidad ovocitaria se cree que puede verse afectada por el estrés calórico, siendo menor la obtención de embriones *in vitro* (Chen, 2001).

En éste trabajo se evaluará la producción ovocitaria y de embriones *in vitro* en dos épocas del año en vacas Holstein Friesian, teniendo como hipótesis que es mayor la producción de ambas variables en invierno que en verano.

1.1 HIPÓTESIS.

La producción ovocitaria y de embriones *in vitro* en vacas Holstein Friesian es mayor en invierno que en verano.

1.2 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la producción ovocitaria y de embriones *in vitro* en dos épocas del año en vacas Holstein Friesian.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1- Determinar la cantidad y calidad de ovocitos producidos en vacas Holstein en invierno y verano.
- 2- Determinar la cantidad y calidad de embriones producidos *in vitro* en vacas Holstein en invierno y verano.

2.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Ciclo estral y dinámica folicular

Para llevar a cabo un programa reproductivo en una explotación lechera, es esencial conocer el ciclo estral de la vaca, así como los factores que lo regulan. Durante los últimos años ha habido un rápido desarrollo de las tecnologías reproductivas que han incrementado la eficiencia y la genética de las vacas. Algunas de estas tecnologías incluyen la sincronización de celos, transferencia de embriones, inseminación artificial, semen sexado, ecografía y producción de embriones in-vitro acompañado de tecnologías para la mejora genética (Seidel, 1995).

El ciclo estral es el tiempo que ocurre entre dos periodos estrales, también llamado celo o calor, y varía normalmente entre 17 a 24 días, considerándose 21 días como el tiempo promedio.

El proceso de continuo crecimiento y regresión – atresia - de los folículos antrales, que conduce al desarrollo de un folículo dominante, es la definición para la dinámica folicular. Una onda de desarrollo folicular implica el crecimiento de un gran número de folículos antrales de pequeño diámetro (2 – 4 mm) que se hacen evidentes ultrasonográficamente (4 – 5 mm). La selección del folículo 5 dominante y la regresión atresia de los folículos subordinados, para llegar finalmente a la atresia o la ovulación del folículo dominante si persiste o no el cuerpo lúteo -o las concentraciones de progesterona del diestro (Kastelic, 1994).

La dinámica folicular está conformada por tres procesos: Reclutamiento. Es el periodo en el cual un grupo -cohorte- de folículos dan inicio a su maduración bajo un ambiente de gonadotropinas propicio que permita su desarrollo hasta la ovulación. Selección. Es el proceso de escogencia de un solo folículo de la cohorte reclutada, el cual no sufre atresia y adquiere el potencial para llegar a ovular. Dominancia. Es el proceso por el cual el folículo dominante seleccionado inhibe el surgimiento de una nueva cohorte de folículos (Lucy, 1992; Ginther, 1996). La maduración folicular ocurre en oleadas a lo largo del ciclo estral, que implican el reclutamiento de una cohorte de folículos lo cual parece empezar con el reclutamiento de un grupo de folículos primarios varios ciclos atrás- que se hacen

visibles como cohorte por ultrasonografía, entre 4 – 5 mm de diámetro; una vez se detecta la onda folicular ésta sigue creciendo hasta que dos días después se evidencia el crecimiento de un folículo que sobresale de la cohorte y se hace dominante con un diámetro aproximado de 8 mm en tanto que los demás folículos cesan su crecimiento y se denominan folículos subordinados. Una vez se evidencia la dominancia folicular continúa una fase de crecimiento del folículo dominante hasta que alcanza su diámetro preovulatorio de 18 - 22 mm en ganado de leche y de 14 - 18mm (Anderson, 1994) e incluso 10 mm (Rhodes, 1995) en ganado de carne, éste se mantiene durante varios días.

Fase estática: hasta un punto en el cual empieza la fase de degeneración si su período de latencia concuerda con el predominio de las concentraciones de progesterona típicas del diestro. Las fases de crecimiento y estática abarcan a su vez el período de dominancia. Las vacas y novillas que ovulan oocitos a partir de folículos en fase de crecimiento tienen tasas de concepción significativamente mayores, a comparación con aquellas que ovulan de folículos persistentes (Anderson, 1994). Se ha detectado que las vacas pueden tener ciclos estrales de dos o de tres ondas foliculares en promedio, aunque, se pueden encontrar ciclos estrales de una sola onda o de cuatro ondas foliculares. Estudios hechos en vacas han demostrado que una misma hembra puede presentar ciclos de dos, tres y cuatro ondas foliculares, dependiendo de diversos factores que sugieren 7 adaptaciones de la hembra a las cambiantes condiciones del ambiente (Rhodes, 1995). La dinámica folicular no se limita solo al desarrollo de varias ondas foliculares durante el ciclo, sino también al ajuste del ciclo al número de ondas foliculares durante el mismo; es así como en ganado lechero se ha detectado un promedio de 18 días para el ciclo de las vacas con dos ondas foliculares, 21 días para el ciclo de las vacas con tres ondas y 24 días para el de vacas con cuatro ondas. Por observaciones de campo se han detectado vacas que regresan al estro en un lapso de 10 días, lo que probablemente representa ciclos de una onda folicular. Del mismo modo, la duración de los períodos de crecimiento, dominancia y latencia del folículo dominante, varían dependiendo de la oleada del ciclo en la cual se presente (Ginther, 1996).

Dinámica de las ondas foliculares

- 1) las ondas foliculares se suceden en un lapso de 6 - 10 días.
- 2) el folículo dominante de la onda solo ovula cuando caen las concentraciones plasmáticas de progesterona del diestro por la lisis del cuerpo lúteo
- 3) cada vez que ocurre la lutéolisis es posible encontrar un folículo dominante viable, dispuesto a ovular varios días después (Maldonado, 1997).

2.1.1 Control neurológico y endocrinológico del ciclo estral.

El ciclo estral está regulado por la interacción de varios órganos: entre ellos están el eje hipotálamo-hipófisis, el ovario y el útero.

En la figura muestra un esquema simplificado de cómo los órganos y hormonas actúan durante el ciclo estral. Las hormonas sirven como mensajeros químicos que viajan por la sangre hacia órganos y tejidos específicos que contienen receptores para hormonas específicas y que regulan las fases del ciclo estral (Lamb, *et al.*, 2009). El ciclo estral está regulado por las hormonas del hipotálamo (hormona liberadora de gonadotropina, GnRH), la pituitaria anterior (hormona folículo estimulante, FSH y hormona luteinizante, LH), los ovarios (progesterona, P4; estradiol, E2 e inhibinas) y el útero (prostaglandina F₂α, PGF). Estas hormonas actúan a través de un sistema de retroalimentación positiva y negativa para gobernar el ciclo estral del bovino (Stevenson, 2007).

2.1.2 Hipotálamo

Forma parte de la base del cerebro y sus neuronas producen la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas o (GnRH); la GnRH se difunde a través de los capilares al sistema hipofisiario y de allí a las células de la hipófisis anterior, en donde su función es estimular la producción y secreción de las hormonas hipofisiarias Hormona Folículo Estimulante (FSH) y Hormona Luteinizante (LH) entre otras (Galina, 2012).

2.1.3 Hipófisis.

Consta de una parte anterior y otra posterior. La hipófisis anterior o adenohipófisis produce varios tipos de hormonas de las cuales la Hormona Folículo estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH) cumplen un papel relevante en el ciclo estral. La FSH es la encargada del proceso de esteroideogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular y la LH es la que interviene en el proceso de ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. La hormona oxitocina, que también es producida en el hipotálamo, es almacenada en la adenohipófisis e intervendrá en los procesos de parto, bajada de la leche, transporte de esperma en el útero, así como en el proceso de autólisis o ruptura del cuerpo lúteo en el ovario (Galina, 2012).

2.1.4 Fases del ciclo estral.

El ciclo estral se puede dividir tres fases: 1. Fase Folicular o de regresión del cuerpo lúteo (Proestro) 2. Fase Periovulatoria (Estro y Metaestro) 3. Fase Lúteal (Diestro).

2.1.5 Fase folicular o proestro.

La fase del proestro se inicia con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior o luteolisis y termina con el inicio del estro o celo; dura alrededor de dos o tres días. La destrucción del cuerpo lúteo ocurre gracias a la acción de la $PGF2\alpha$ de origen uterino. Con la caída de los niveles de progesterona, el efecto de retroalimentación negativa que ejercía a nivel hipotalámico desaparece y comienza a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas FSH y LH las cuales estimulan el crecimiento folicular. (Lamb, *et al.*, 2009).

2.1.6 Fase Periovulatoria (estro – metaestro)

El estro se define como un periodo de actividad y receptividad sexual en donde el signo principal es que el animal se mantiene en pie y quieto al ser montado por otro. También se observa, entre otros signos, inquietud, inflamación de la vulva, secreción de moco claro y transparente que sale por la vulva (Shearer, 2003). El olor del moco atrae y excita al toro debido a la presencia de feromonas. La duración

de celo es muy variable entre grupos de animales variando entre 30 minutos a más de 30 horas. Pero se considera que 16 ± 4 horas es el tiempo promedio (Lucy, 2006).

De 12 a 24 horas desde el comienzo del celo, el sistema nervioso central del animal se hace refractario a los estrógenos y todas las manifestaciones de celo o calor desaparecen. Inmediatamente después de finalizado el celo se inicia el metaestro que puede durar de 3 a 5 días. Durante el metaestro ocurre la ovulación, que tiene lugar entre 28 a 32 horas después de haberse iniciado el celo, o entre 10 a 15 horas de haber cesado los signos de celo en respuesta al pico preovulatorio de LH. Después de la ovulación se produce una hemorragia y el folículo se llena de sangre, convirtiéndose en una estructura conocida como cuerpo hemorrágico. El proceso siguiente es la luteinización de las células foliculares que se transformaran en células luteales; estos cambios ocurren entre el día 5 a 7 del ciclo, finalizando así la fase de metaestro e iniciándose la fase lútea o diestro.

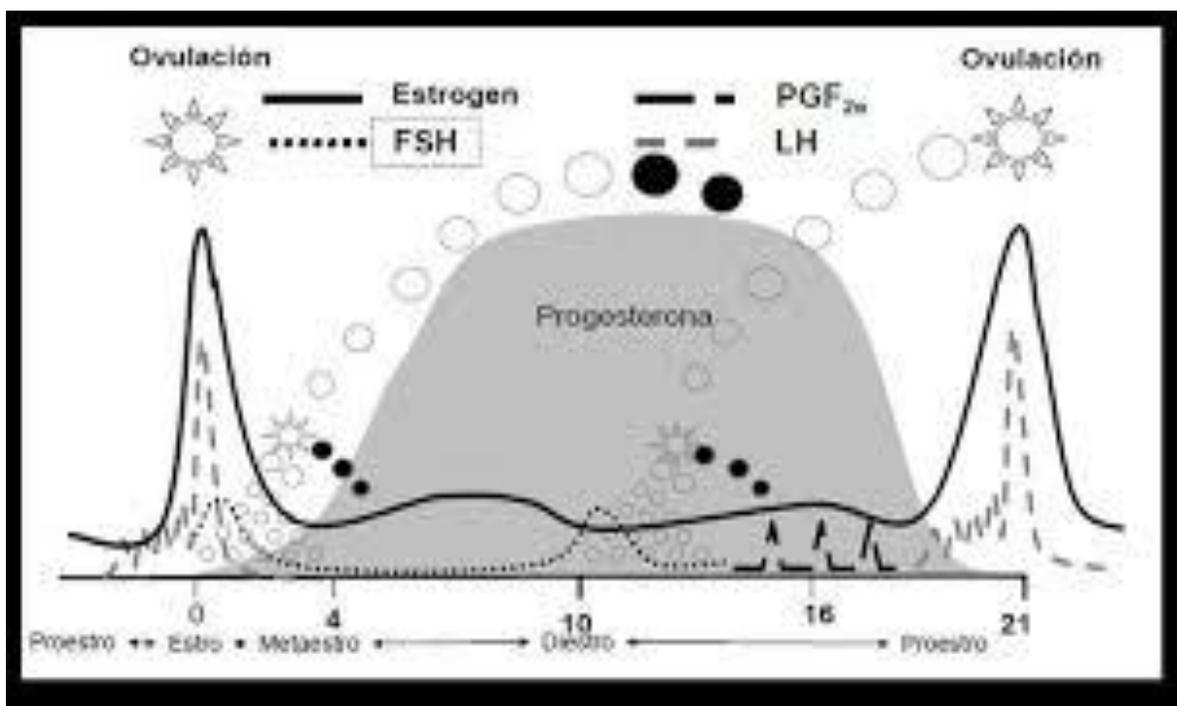


FIGURA 1. Esquema de hormonas del ciclo estral.

2.1.7 Fase Lútea o Diestro

El diestro es la etapa de mayor duración del ciclo estral (12 a 14 días). Durante esta etapa el cuerpo lúteo mantiene su plena funcionalidad, lo que se refleja en niveles sanguíneos de progesterona mayores de 1 ng/ml. Además, en esta fase se observan las ondas de desarrollo folicular, por lo cual se pueden observar folículos de diferente tamaño (Lamb, *et al.*, 2009).

2.1.8 Dinámica folicular

Se conoce como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos primordiales que conllevan al desarrollo de un folículo preovulatorio. En vacas, el desarrollo folicular ocurre en forma de ondas y se observan tanto en animales jóvenes como adultos, en vacas preñadas (excepto durante los últimos 30 días de gestación), durante el postparto y durante el ciclo estral. Entre 1 y 4 ondas de crecimiento y desarrollo folicular ocurren dentro un ciclo estral y el folículo preovulatorio se origina a partir de la última onda (Lucy, 1992; Ginther, 1996).

2.1.9 Reclutamiento

Es la primera fase que se caracteriza por el nacimiento o el inicio de una nueva onda folicular, una cohorte de folículos de aproximadamente 3 mm de diámetro es estimulada por un aumento transitorio de la hormona FSH. El pico de FSH ocurre cuando el futuro folículo dominante alcanza un tamaño de aproximadamente 4 mm y luego los niveles de FSH disminuyen. El proceso por el cual la FSH declina es desconocido (Lamb, *et al.*, 2009).

2.1.10 Selección

Es el proceso por el cual un único folículo es elegido para ser dominante y evita la atresia, este folículo se diferencia de los demás ya que desarrolla receptores específicos para LH necesarios para su crecimiento, desarrollo final y para realizar

la ovulación. Los demás folículos de esa cohorte se denominan folículos subordinados y se vuelven astrésicos, tal vez por la disminución en los niveles de FSH (Maldonado, 1997).

2.1.11 Dominancia.

Es el proceso por el cual el folículo dominante ejerce un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos. Este efecto inhibitorio se mantiene hasta que esta dominancia desaparece bien porque el folículo muere o porque el folículo es ovulado (Lamb, *et al.*, 2009). Este folículo que alcanza un tamaño marcadamente mayor que los demás es el responsable de la secreción de estradiol y adquiere la capacidad de continuar creciendo incluso en presencia de otras hormonas que crean un medio adverso para el resto de los folículos. Con la ovulación o destrucción del folículo dominante, se produce un nuevo incremento de FSH y una nueva onda folicular se inicia.

2.1.12 Ovarios.

Son glándulas que tienen básicamente dos funciones: una exocrina, que es la liberación de óvulos, y otra endocrina, que es la producción y secreción de hormonas. Histológicamente el ovario está constituido por una envoltura externa de epitelio simple cúbico sobre la túnica albugínea de tejido conjuntivo denso. El parénquima se diferencia en una zona cortical donde se desarrollan los folículos ováricos, y una zona medular muy vascularizada e inervada, que se continua con el hilio del órgano (Porras, 2009).

2.1.13 Hormonas ováricas

Entre las hormonas que producen los ovarios podemos citar los estrógenos o estradiol, la progesterona y la inhibina. Los estrógenos son hormonas esteroides producidas en el folículo ovárico y son los responsables de estimular la conducta sexual o de celo actuando sobre el sistema nervioso central del animal; además, tienen acción sobre otros órganos del aparato reproductivo como son las trompas

de Falopio, el útero, la vagina y la vulva. Los estrógenos tienen un efecto de retroalimentación positiva sobre el hipotálamo produciendo la liberación de GnRH que a su vez inducirá la liberación de FSH y LH en la hipófisis anterior. La progesterona es también una hormona esteroide producida en el cuerpo lúteo por acción de la LH; es responsable de la preparación del útero para permitir la implantación del embrión y de mantener la gestación. Produce un efecto de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo. La inhibina es una hormona proteica producida en el folículo que interviene en el mecanismo de regulación de la secreción de FSH y tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la hipófisis anterior produciendo una menor secreción de FSH. (Galina, 2012)

2.1.14 Útero.

Órgano tubular que conecta el cérvix con el oviducto, conformado por dos cuernos y un cuerpo, histológicamente está recubierto de una membrana mucosa, llamada endometrio con abundantes glándulas simples, excepto en las carúnculas que no son glandulares. Las carúnculas son proyecciones o pequeños botones de la superficie interna del útero, donde se fijan, por medio de los cotiledones, las membranas fetales durante la gestación.

El cuerpo del útero se bifurca en dos cuernos (izquierdo y derecho) y es en uno de estos donde se va a implantar el embrión y a desarrollar el feto durante el período de gestación.

Las carúnculas durante la preñez aumentan su tamaño, se entrelazan con otras estructuras semejantes que se desarrollan en la placenta fetal o sea los cotiledones, a través de los cuales se alimenta el ser que comienza a formarse. A medida que aumenta el período de gestación, aproximadamente 282 días, el útero aumenta considerablemente de tamaño hasta dar cabida a un ternero, que puede llegar a pesar hasta 40 kilogramos al momento del nacimiento según la raza; además aproximadamente 20 litros de líquido amniótico y una placenta que puede pesar 5 kilogramos.

Produce la Prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) la cual interviene en la regulación del ciclo estral mediante su efecto de luteolisis o regresión del cuerpo lúteo. También interviene en los procesos de ovulación y parto. (Sequeira MSc., 2013)

2.2 Importancia de la calidad ovocitaria en la producción de embriones

Una etapa crítica en el procedimiento de fertilización *in vitro* (FIV) es la elección de ovocitos de buena calidad para poder garantizar un óptimo desarrollo, los aspectos más importantes que evalúan la calidad del ovocito son: Estado nuclear, características citoplasmáticas, aspectos de la corona radiada y la expansión o distribución de las células del cumulus, así como el diámetro de los ovocitos, que condicionan su capacidad para madurar de tal forma que los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110 μm se encuentra todavía en fase de crecimiento y no han adquirido la capacidad para madurar. (Samaniego, 2017).

2.2.1 Métodos para la obtención de ovocitos.

Hoy en día existen diferentes métodos mediante los cuales se puede obtener ovocitos tanto de animales vivos como de ovarios de matadero para el proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos (Lorenzo, 1992).

2.2.2 Obtención de ovocitos post mortem.

Está claro que la forma más sencilla y económica de obtener ovocitos es a través de ovarios de vacas sacrificadas en el matadero, de los cuales se aspiran los folículos con un diámetro que oscile entre 3 y 6 mm. Así, dependiendo del momento del ciclo ovárico en que se encontraban, de cada vaca se pueden recolectar entre 8 y 15 ovocitos, de los cuales entre un 50 y 60% pueden tener la calidad suficiente para madurar, ser fecundados, clivar y avanzar al estadio de blastocito (Peláez, 2011).

2.2.3 Aspiración folicular (OPU)

Este método consiste en la aspiración de los folículos que se encuentran en la superficie ovárica y que tienen un diámetro mayor a 2 mm (Gardón, 1999), aunque se ha indicado que se deben aspirar aquellos folículos que se encuentran entre 3 y

6 mm de diámetro (Peláez, 2011). La aspiración se realiza con una aguja con un calibre entre 18 y 21 G conectada a una jeringa de 10 ml. El calibre de la aguja empleada, tiene mucha importancia para preservar la integridad de los ovocitos.

La técnica consiste en cargar 1-2 ml de PBS en la jeringa conectada a la aguja, y luego proceder a succionar los folículos de la superficie ovárica que se encuentren entre los diámetros recomendados. Para realizar esta operación se ingresa por el estroma del ovario adyacente al folículo y este no se punciona directamente para evitar comprometer la integridad del mismo. Una vez obtenido el líquido folicular, se coloca en un tubo de precipitación dejándolo decantar por 10 a 20 minutos, para posteriormente eliminar el sobrenadante y aspirar, coloca el pellet en una caja Petri con PBS, con el fin de hacer la búsqueda y selección de los ovocitos aptos para continuar con la fase de maduración, bajo una lupa estereoscópica (Peláez, 2011; Gardón, 1999).

2.2.4 Seccionamiento de ovario.

A este método se lo conoce también con el nombre en inglés “slicing”, que básicamente consiste en hacer varios cortes longitudinales y transversales en la superficie ovárica, con el fin de seccionar los folículos localizados en la corteza ovárica y obtener los COCs que son recogidos en un vaso precipitado luego lavar el ovario (Sierra, 2015).

2.2.5 Obtención de ovocitos *in vivo*

Los ovocitos se obtienen de animales vivos, ya sean hembras jóvenes, vacas en producción o de descarte. Permite entre otras cosas acortar el intervalo generacional de animales genéticamente superiores, produciendo un número elevado al año de embriones viables y terneros por cada donadora, incrementando además la eficiencia productiva de los hatos ganaderos (Zárate, 2006).

2.2.6 Recolección de ovocitos por medio de laparoscopia.

Anteriormente se empleaba la laparoscopia como técnica para la recuperación de ovocitos, que tenía como ventaja el bajo costo del equipo en comparación con el de OPU que es mucho más costoso. En la actualidad esta técnica ha caído en desuso debido a varias desventajas, por ejemplo, que no se puede visualizar el corte de pequeños folículos en crecimiento por debajo de la superficie del ovario, por otra parte, se conoce de efectos adversos relacionados con el bienestar animal, como la formación de adherencias en el lugar de la cirugía, además de ser una técnica muy invasiva (Zárate, 2006).

2.2.7 Factores que afectan la calidad del ovocito

Sin lugar a duda existen muchos factores que afectan la calidad y cantidad de los ovocitos que pueden ser obtenidos en un animal; estas afecciones pueden comprometer la competencia funcional de los ovocitos, así como también alterar sus características morfogénicas, todo lo cual puede evidenciarse en la capacidad de estos para madurar, ser fecundados, clivar y alcanzar el estadio de blastocito (Alvarado, 2017).

2.2.7.1 Edad del animal

Los ovarios de vacas adultas generan menos ovocitos que las que proporcionan las novillas. Sin embargo, según Mermillod, *et al.*, (2008) los ovocitos de las hembras pre-púberes son menos aptos que los que se obtiene de vacas adultas. Se pueden obtener ovocitos tanto de animales jóvenes como de animales viejos, pero estos no se desenvuelven de forma igual al momento de los procesos biotecnológicos (Alvarado, 2017). El número aproximado de folículos preantrales para una vaquilla es de 109 000 y para una vaca es de 89 000, sin embargo, este número disminuye con el paso de los años (Quispe, *et al.*, 2015).

2.2.7.2 Categoría de los animales.

La variabilidad que existe entre animales de carne y leche es obviamente notoria, la diferencia que consta entre las razas influye en la recuperación de los ovocitos, las hembras de raza Bos indicus genera un número mayor de ondas foliculares e igualmente la población folicular es mayor que las de raza Bos Taurus. (Quispe, *et al.*, 2015).

2.2.7.3 Condición nutricional.

La importancia de la nutrición sobre la calidad de los ovocitos es un tema que actualmente no se ha explotado totalmente y la información es limitada (Becaluba, 2007). La nutrición afecta contundentemente la reproducción de las vacas, un exceso o deficiencia de nutrientes, el bajo consumo de materia seca, la alimentación inadecuada en el periodo de transición puede afectar seriamente a los ovocitos (Campabadal, 2009), así como también las dietas altas en amoníaco interfiere en la disponibilidad de ovocitos competentes (Alvarado, 2017).

2.2.7.4 Tamaño de ovarios.

Alvarado (2017) indicó que el número de ovocitos está estrechamente relacionado con el tamaño y peso del ovario, por lo tanto, en vacas adultas el número de ovocitos que se puede recuperar es mayor que en hembras jóvenes.

2.2.7.5 Enfermedades intrauterinas

El útero de todas las vacas se contamina con bacterias después del parto, pero esto no implica necesariamente infección, ni desarrollo de enfermedad uterina. Las vacas normalmente logran controlar esta contaminación e inclusive las infecciones más severas en el transcurso de la involución del útero, pero si la contaminación se traduce en infección y esta persiste, se desarrollará enfermedad uterina (Lewis, 1997). Las enfermedades uterinas posparto más comunes son:

1. **Endometritis**, es la inflamación superficial del endometrio, que no se extiende más allá del estrato esponjoso y los tejidos glandulares subyacentes, con evidencia histológica de inflamación, está caracterizada por la presencia de exudado purulento o mucopurulento en la vagina 21 días o más después del parto (Sheldon, *et al.*, 2006). Los patógenos más comunes en este tipo de cuadros son: Arcanobacterium pyogenes y bacterias gram negativas anaerobias obligadas (Fusobacterium necrophorum, Prevotella y Bacteroides ssp.) (Foldi, *et al.*, 2006).
2. **Metritis**, es el proceso inflamatorio que afecta todas las capas del útero: endometrio, submucosa, muscular y serosa (BonDurant, 1999). Según los signos clínicos se puede clasificar como metritis puerperal y metritis clínica (Sheldon, *et al.*, 2006; Lewis, 1997). Frecuentemente se presenta con vaginitis y cervicitis, y si esta infección logra extenderse a través de la pared uterina puede causar perimetritis y peritonitis (Christensen, *et al.*, 2009).
3. **Piometra**, es un proceso caracterizado por la acumulación de material purulento o mucopurulento dentro del lumen uterino en presencia de un cuerpo lúteo activo. Puede producir piometra cuando:
 - Ocurre muerte fetal, seguida por la invasión de bacterias patógenas como A. Pyogenes y la persistencia del cuerpo lúteo de la gestación.
 - Se produce infección durante el diestro en caso de inseminación artificial fuera de tiempo (Sheldon, *et al.*, 2004).

2.2.7.6 Evaluación de la calidad de del ovocito.

Clasificación morfológica: De acuerdo a Zarate (2006) indica que la elección correcta de ovocitos de buena calidad puede ser la diferencia entre el éxito o el fracaso de la producción *in vitro* de embriones. También Sierra (2015) aclara que debe elegir ovocitos tipo A y B que son los adecuados para someterse a la maduración. Estos mismos autores indican que los ovocitos pueden clasificarse de acuerdo a las características de las células del cúmulo y del citoplasma en:

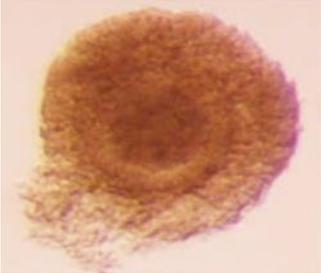
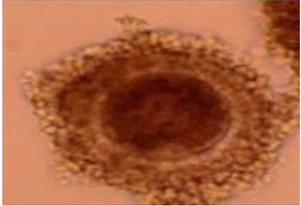
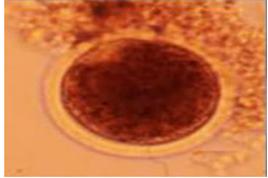
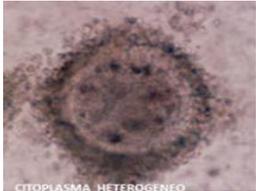
TIPO/ CATEGORIA	CARACTERISTICAS	IMAGEN
I	Dentro de este grupo se encuentran los ovocitos con varias capas de células del cúmulo en un número mayor a 4 capas y compacta, citoplasma transparente y homogéneo.	
II	Ovocitos con 1-3 capas de células del cúmulo, citoplasma homogéneo con algunas zonas oscuras.	
III	Ovocitos total o parcialmente desnudos con un citoplasma irregular con zonas oscuras.	
IV	Los ovocitos poseen un cúmulo con las células expandidas y citoplasma irregular con zonas oscuras.	

FIGURA 2. Clasificación morfológica de los ovocitos.

Los ovocitos tipo A y B que llegan a ser fertilizados mediante FIV y consiguen dividirse (80% los A y 77 % los B), llegando a blastocitos (40% de los A y 20% de los B). En cuanto a los tipos C y D consiguen dividirse (40% los C y 34% los D), no pudiendo alcanzar su desarrollo hasta blastocito (Gonzales, 2013).

2.3 Importancia del estrés calórico en la producción de embriones.

Los bovinos, al igual que todos los mamíferos, son animales endotérmicos; es decir, organismos que a pesar de las fluctuaciones en la temperatura ambiental son

capaces de mantener relativamente constante la temperatura corporal. Esta homeostasis es esencial para una multitud de reacciones bioquímicas y procesos fisiológicos asociados con el normal metabolismo; pero esta capacidad se ve amenazada por fuerzas adversas intrínsecas o extrínsecas, los estresores. Un estresor es cualquier cambio medioambiental que rompe la homeostasis (Cunningham y Klein, 2014).

El estrés calórico es la fuerza ejercida por los componentes del ambiente térmico sobre el organismo, causando en él una reacción fisiológica proporcional a la intensidad de la fuerza aplicada y a la capacidad del organismo en compensar las desviaciones causadas por esta fuerza. Por lo tanto, el estrés térmico afecta todo el sistema neuroendocrino, desencadenando eventos fisiológicos y comportamentales con el objetivo de mantener la homeostasis en detrimento de los procesos productivos y reproductivos (Ramos, 2008).

En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha observado que el estrés calórico compromete la competencia del ovocito para ser fertilizado. y el desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocito (Sartori, et al., 2002).

Se ha descrito que la susceptibilidad del embrión al estrés calórico se da en los primeros tres días de edad y que los embriones desarrollados *in vitro* son más resistentes a este efecto cuando presentan un desarrollo de 4 a 8 células (Hansen, 2007).

La transferencia embrionaria se ha visto como una alternativa para incrementar la tasa de gestación de las vacas lecheras en épocas cálidas. Varios estudios realizados en vacas receptoras de embriones frescos producidos *in vitro* o de embriones recolectados de vacas superovuladas han informado una mejora de la tasa de gestación en condiciones de estrés calórico, comparada con la observada en vacas servidas con inseminación artificial. (Vasconcelos, et. al., 2006).

2.3.1 Fisiopatología del estrés calórico.

Estrés calórico, se define a todos los efectos del medio ambiente que ejercen una respuesta en un organismo, que a su vez este desencadena un complejo sistema

de control, con el fin de volver a la armonía y bienestar; sin embargo, si el agente casual persiste, el organismo empieza una incapacidad prolongada para dominar la fuente de peligro potencial, que se lleva a la activación de sistemas de emergencia frente al peligro más allá de su rango de máxima eficacia (Zuñiga, 2000).

La hipertermia incrementa la actividad metabólica y el consumo celular de oxígeno (se incrementa 10% por cada grado C en seres humanos). En mamíferos cuando la temperatura corporal excede los 41°C, la necesidad de oxígeno excede la cantidad de oxígeno que puede suministrar la respiración normal, lo cual puede llevar al individuo a un daño celular por hipoxia. El encéfalo, el hígado y los riñones son los órganos más afectados (Moberg,1995).

2.3.2 Efectos del estrés sobre la reproducción en bovinos.

La temperatura ambiente elevada puede reducir la eficiencia reproductiva tanto en hembras como en machos, afectando la gametogénesis, la libido, el estro, la ovulación, la fertilidad, la implantación, la supervivencia embrionaria, la duración de la gestación y la habilidad materna, así como aumento de los problemas en el momento del parto (Furtado, 2006).

Dobson y Smith (2000), indicaron que el proceso de la reproducción es un sistema fisiológico muy importante para el desarrollo de las especies, ligado al estrés, Coubrough (1985), lo ha clasificado en dos grupos: estrés ambiental y estrés por manejo. El estrés ambiental incluye a la temperatura del ambiente, al frío y/o frío calor, al viento y a la humedad. El estrés por manejo incluye a la densidad animal, a los procedimientos de manejo, al flujo de animales, a la interacción entre animales de la misma o diferente especie y la condición social existente, como: angustia psicológica inespecífica, ruido; trauma físico, etc. La combinación de ambos tipos de estrés, actúan como estresantes, lo cual compromete a la homeostasis del animal. Por otro lado, Dobson y Smith (1995), mencionaron los siguientes tipos de estrés: físico, que incluye al transporte de animales y al daño físico; psicológico, en el cual se contempla el aislamiento de los animales; fisiológico, que se considera a

la hipoglucemia y a los cambios en la presión sanguínea, aspectos todos relacionados con el proceso reproductivo de los mamíferos.

A continuación, se describen algunas repercusiones del estrés calórico sobre la reproducción en el macho y la hembra.

Macho.

Calidad seminal: El estrés ambiental puede provocar baja calidad seminal, la cual está íntimamente relacionada con la baja fertilidad, debido probablemente a una combinación de bajas tasas de fertilización. Los testículos al estar suspendidos en el escroto, la espermatogénesis es afectada al exponerse a altas temperaturas en el exterior baja calidad espermática, lo cual también está directamente relacionado con la calidad del eyaculado. La baja calidad seminal es debida principalmente a las afectaciones que sufren las células de Sertoli por el estrés calórico; este a su vez induce apoptosis, estrés oxidativo en dichas células, el cual puede inducir a la infertilidad por el daño que ocasiona en los lípidos y proteínas de la membrana del espermatozoide, también por el daño que provoca en el ADN del espermatozoide, esto se traduce a un pobre desarrollo embrionario y abortos involuntarios (Nezhad *et al.*, 2013; Wechalekar *et al.*, 2010).

Hembra.

El comportamiento sexual y la tasa de fertilidad, son los principales indicadores en la reproducción de las hembras mamíferas que se afecta negativamente por el estrés ambiental. De tal manera que los programas emprendidos con el fin de aumentar la fertilidad de las hembras domésticas, tienen menor éxito en las épocas calurosas que en las templadas (Chemineau, 1993).

El estrés por calor compromete el eje hipotálamo hipófisis, afectando la pulsatilidad de las gonadotropinas, lo cual a su vez incide de manera negativa sobre la expresión de signos que hagan evidente el celo al ocasionar alteraciones sobre el crecimiento

folicular y conduciendo a la inhibición del desarrollo embrionario. En vacas de la biodurante 20-50 días antes de la inseminación artificial, se observaron tasas de gestación menores que en vacas que no fueron expuestas a esa condición ambiental (Castaño *et al.*, 2014).

Un aumento en la temperatura uterina de 0.5°C, durante días calurosos, provoca disminución de la tasa de fecundación. En los bovinos, la exposición de novillas a 32°C durante 72 horas después de la inseminación artificial, inhibe el desarrollo embrionario, sin embargo, se sabe que el 48% de las hembras mantenidas 21°C, pueden quedar gestante sin problema alguno, incluso si el estrés térmico se presenta después de los 10 días posterior al servicio, la fertilidad no es afectada.

El estrés calórico (EC) también actúa directamente sobre el ovocito y la función folicular, comprometiendo la calidad del mismo y promoviendo alteraciones de la dinámica folicular, afectando directamente la fertilidad en vacas lactantes; en estudios se ha demostrado que la fertilidad puede variar según la estación del año, por ejemplo, en invierno disminuye cerca del 50%; en verano 20% y en el otoño es más baja que en el invierno. Se ha podido observar que en verano el 80% de los estros pueden ser indetectables. Además, se ha indicado que cuando las temperaturas rectales de los animales aumentan de 38.5 a 40°C en 72 horas después del servicio o la inseminación, las tasas de preñez pueden disminuir hasta en el 50% (Castaño, *et al.*, 2014).

Varios estudios han indicado que, en el ganado bovino, el desarrollo embrionario es altamente sensible a altas temperaturas, entre los primeros tres a 11 días después del servicio; adquiriendo más tolerancia a altas temperaturas a medida que el periodo de gestación avanza. Se sabe que los embriones obtenidos mediante fecundación *in vitro* (FIV), son más susceptibles al estrés calórico que los obtenidos en condiciones naturales. La mayor pérdida de embriones de bovinos obtenidos de FIV, ocurren antes de los 42 días, cuando las hembras están bajo estrés calórico (Ambrose, *et al.*, 1999; Ealy *et al.*, 1994).

2.3.3 El efecto del estrés calórico sobre los gametos y embriones.

Temperaturas extremas afectan la supervivencia del ovocito y del espermatozoide, así como el desarrollo embrionario en el aparato reproductor de la hembra. Esto ocasiona que, al aumentar la temperatura corporal de las hembras, el embrión pueda perder su viabilidad y reabsorberse. Por esta razón, las tasas de concepción caen en los meses de verano hasta en un 20%. El ganado con predominancia fenotípica *B. indicus* presenta mejores tasas de maduración y fecundación *in vitro* que el ganado predominantemente *B. taurus*, debido a que sus ovocitos son más competentes con genes termotolerantes, capaces de resistir las condiciones ambientales del trópico (Báez, 2010).

La tasa de fertilización y el desarrollo embrionario se afectan. Al respecto, se ha descrito que el estrés calórico afecta el desarrollo final del folículo ovulatorio y la maduración y competencia del ovocito, lo que repercute negativamente en la tasa de fertilización y en la sobrevivencia embrionaria temprana y tardía.

Sartori (2002) Menciona que aún no se sabe el mecanismo exacto por el cual el estrés calórico puede afectar los folículos y los ovocitos, pero se ha descrito que se produce un daño en la comunicación entre las células de la granulosa, del cúmulo y del ovocito lo cual afecta la competencia del ovocito para ser fertilizado y altera el contenido proteínico, la viabilidad de las células de la granulosa y de la teca interna, produciendo cambios en la esteroidogénesis.

El estrés térmico desencadena alteraciones agudas y crónicas en concentraciones plasmáticas de cortisol y hormonas tiroideas; además, puede acarrear alteraciones en las reacciones fisiológicas y en el comportamiento de los animales. Factores como el clima, el medio ambiente cambiante, el ruido y la alta densidad animal son causantes de estrés, y desencadenan serios problemas reproductivos que influyen en la disminución de fertilidad, en la alteración del desarrollo folicular y en los ovocitos, lo cual afecta el potencial para desarrollar un embrión viable.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del área de estudio

El estudio de campo se realizó en establos lecheros comerciales localizados en la Comarca Lagunera, a una Latitud 24° 22' Norte y 102° 22' Oeste de longitud, con 1,120 metros sobre nivel del mar. Con condiciones climáticas: Región semiárida, seca precipitación pluvial anual 250 mm. La Temperatura media anual de 25 °C, con máximas de 45 y mínimas de -5 °C, humedad relativa del 20-25 %.

El estudio se llevó a cabo en dos épocas del año, una que corresponde a la época de invierno y la segunda época que corresponde a verano. Todos los animales utilizados en el experimento fueron sometidos a un examen ginecológico y solo fueron seleccionadas aquellas sin trastornos reproductivos perceptibles. Todas las vacas son alimentadas mediante forraje, concentrados, suplementos minerales, vitamínicos y agua limpia a libre acceso. Estos animales están sometidos bajo vigilancia veterinaria según lo dispuesto en el programa sanitario y en producción normal de su lactancia.



FIGURA 3. Localización del área de estudio, Torreón, Coahuila, México.

3.2 Animales experimentales.

Todas las vacas donadoras de los ovocitos en el experimento se monitorearon desde el parto y solo fueron seleccionados los animales que no tuvieron trastornos reproductivos de acuerdo al examen ginecológico, ni ningún otro padecimiento de salud. Además, al momento del experimento las vacas tuvieron en la misma etapa de lactancia, el mismo nivel de producción.

para evaluar su competencia en un programa de producción *in vitro* de embriones como parte de esta investigación. Los registros y animales incluidos en esta

investigación tuvieron el mismo nivel de producción (10,000 Kg por lactancia de 305 días o 32 litros promedio por día fueron vacas altas productoras).

Todos los animales estaban libres de enfermedades infectocontagiosas según registros de salud veterinaria, cumpliendo con las buenas prácticas de control de salud. Los registros o animales que presentaron reporte de alguna enfermedad, trastorno reproductivo, metabólico, podal u otro proceso inflamatorio no se incluyeron en el estudio.

3.3 Las vacas al momento del experimento tuvieron:

- Mismos días en leche (60-70 DEL).
- 3 partos.
- Mismo nivel de producción (10,000 kg/lactancia)

Se eligió como donadoras de ovocitos 5432 vacas Holstein Friesian altas productoras de leche, en óptimas condiciones de salud y reproductivas para un programa de producción *in vitro* de embriones, se buscará la homogeneidad de todas estas con las mismas condiciones, parámetros reproductivos y alimentación ya mencionada. Los ovocitos se colectarán por el método de aspiración folicular transvaginal “Ovum Pick UP” (OPU).

Los ovocitos colectados se dividirán en dos grupos de acuerdo a la época de aspiración folicular y producción embrionaria.

- Grupo 1: verano (n=2936)
- Grupo 2: invierno (n=2496)

Durante el desarrollo del experimento se realizará 1 repetición de aspiración de Ovocitos de los ovarios de las vacas.

Una vez colectados los ovocitos se trasladarán en un medio de transporte a base de solución salina al 0.5 %, con antibiótico al laboratorio particular de la empresa *In vitro Brasil*.

En cuanto al proceso de laboratorio se realizará en el laboratorio ya antes mencionado para el programa de Producción *In vitro* de embriones.

Los rebaños en su totalidad se manejan de manera rutinariamente en dos ordeñas y reproductivamente a base de programas de sincronización de celos, detección de estos, inseminación artificial y diagnóstico de gestación temprana por ultrasonido hecho por un solo personal capacitado para las labores correspondientes.

Se llevan registros productivos y reproductivos almacenados en software especializados, el cual fue el Dairycom®.



FIGURA 4. Vacas altas productoras donadoras ovocitos.

3.4 Sistema de manejo

Los animales estuvieron bajo el mismo sistema de manejo intensivo, no tuvieron diferencias en cuanto a manejo, clima, genética y alimentación. Las vacas estuvieron alojadas en corrales con sombras cubriendo un área de 10 m² por vaca y los comederos con sombra al 100 % manteniendo siempre los echaderos secos y confortables. Al momento de la aspiración folicular las vacas fueron alojadas a un corral de 10 mtr de largo por 5 mtr de ancho con cama de cemento para facilitar su manejo.



FIGURA 5. Corral de aspiración folicular.

3.5 Alimentación.

Todas las vacas fueron alimentadas mediante forraje (50%) y concentrado (50%) con suplementos minerales y vitamínicos que están incluidos en la ración totalmente mezclada (RMT) de acuerdo a las especificaciones del National Research Council (NRC, por sus siglas en inglés) para vacas lecheras con el nivel de producción de acuerdo a su etapa de lactancia, el agua limpia y fresca estuvo a libre acceso. Los ingredientes de la dieta ofrecida a los animales en el periodo de lactancia fueron en base a forrajes como la alfalfa, silo de sorgo, silo de maíz y avena, así como de concentrados como maíz rolando, semilla de algodón y canola.



FIGURA 6. Ración totalmente mezclada (RMT) de establo lechero en condiciones intensivas.

3.6 Materiales a utilizar.

Ultrasonido con sonda guiada, microscopio, espermiocue, porta y cubre objetos, esteroscopio, micro pipeteador, centrifuga, campana de flujo, estufa con CO₂, micropipetas, puntillas, bortex, platina térmica.

3.6.1 Equipo de aspiración folicular.

El equipo de ultrasonografía utilizado para la aspiración folicular *in vivo* fue un ecógrafo CHISON, Digital Ultrasound System, Model: 8300 VET. 5.0 MHz sectorial conectado a un transductor vaginal de 7.5 MHz acoplado a una guía de aspiración folicular con cánula de 20 G x 2", la cual está unida mediante un sistema de aspiración folicular equipado con tubo cónico de 50 ml. para la recolección a una bomba de vacío (Pionner Pro Pump, Pioneer Pro Pump Single – 115v, Single Foot Pedal, PS 653, Canadá).

3.6.2 Proceso de aspiración folicular.

La aspiración folicular fue realizada *in vivo* empleando el método de aspiración folicular transvaginal (OPU). Para este propósito, las hembras fueron sedadas con Xilacina (Prosin, Pisa Agropecuaria, S.A. de C.V. México) al 2% (0.3 ml/vaca IM) y se les aplicó anestesia epidural baja con Lidocaína (Pisacaina, Pisa Agropecuaria, S.A. de C.V. México) al 2 % (3 ml/vaca), para prevenir contracciones rectales y facilitar la manipulación de los ovarios. El sitio de las inyecciones fue desinfectado previamente con alcohol al 70% y sólo fue utilizada aguja y jeringa nueva y estéril por animal. El recto de los animales fue vaciado manualmente y se higienizó todo el tren posterior con un lavado con abundante agua y yodo, además en los genitales externos y la cola del animal se aplicó alcohol al 70% como medida de desinfección.

Se introdujo el transductor por vía vaginal, cubierto con un protector con gel para ultrasonografía. Los ovarios se manipularon rectalmente de forma tal que se colocaron estos contra el transductor y se visualizaron los folículos en la pantalla del ecógrafo. Con la aguja se atravesó la pared vaginal, puncionando de esta forma con presión de vacío de 50 a 65 mm Hg los folículos de entre 3 y 10 mm de diámetro que se tomó como criterio de inclusión para las vacas puncionadas dentro del experimento. Se recogió el aspirado folicular en tubos de recolección, que contenían medio de aspiración (PBS + heparina, en relación 50:1)



FIGURA 7. Equipo utilizado en aspiración folicular in vivo.

3.6.3 Proceso de producción *in vitro*.

El proceso para la producción de embriones *in vitro* se realizó bajo los estándares de en un laboratorio acreditado y con personal capacitado en el desarrollo de esta biotecnología. Se siguieron los protocolos, se utilizó el equipo y material del mismo laboratorio.

Una vez localizados y clasificados los COC's se pusieron en placas de Petri redonda 35 mm y se trasladaron al medio de maduración. (50 COC's aproximadamente/ pozo con 500 microlitros de medio de maduración). Se cerró la placa de maduración y se equilibró en una atmósfera con 5% de CO₂, 5% de O₂ y con 100% de humedad relativa, a una temperatura de 39°C por 24 h. Todo este proceso fue en una incubadora marca Thermo®

Las placas y medios de fertilización se prepararon antes de iniciar la capacitación del semen. Las placas se prepararon de la misma manera que las placas para maduración, se equilibraron durante 3 h, antes de transferir los ovocitos al medio de fertilización y se utilizaron pipetas de transferencia estéril.

3.6.3.1 Separación espermática

Una vez que los ovocitos fueron madurados durante 24 h, se procedió a realizar la capacitación del semen. Para ello se utilizó semen congelado de un mismo lote de un mismo toro de fertilidad comprobada, para eliminar las posibles variaciones que pudieran existir entre toros y lotes. La capacitación del semen se realizó por el método de Percoll.

3.6.3.2 Procedimiento de preparación del Percoll

Se equilibró el Percoll 90%, SP-TL sin BSA y SP-TL con BSA por 1 hora a temperatura ambiente antes de la fertilización, posteriormente, se preparó el gradiente de Percoll (para un gradiente máximo de 750 μ l semen) que equivale al volumen de 3 pajuelas de 250 μ l y se mezcló 1.5 ml. Percoll 90% con 1.5 ml SP-TL sin BSA (en partes iguales) en un tubo de 15 ml para hacer el Percoll de 45%.

Se puso 2 ml de Percoll 90% en un tubo de 15 ml luego se le añadió lentamente 2 ml. de Percoll de 45% (se forman dos capas visibles). Para fertilizar todos los COCs, se utilizaron 2 dosis de semen de 0.25 ml con una concentración total de 2.5 millones de espermatozoides por dosis.

3.6.3.3 Conteo espermático

Para determinar la concentración espermática de la muestra, se utilizó el hemocitómetro, realizándose el siguiente procedimiento: se preparó una dilución 1:100 del semen, para lo cual se mezcla 5 μ L del semen preparado y 495 μ L de agua destilada en un tubo de microcentrífuga de 1 ml colocándose exactamente 10 μ L de esta mezcla en cada placa del hematocitometro para realizar el conteo.

Se agregó aproximadamente 1 millón de espermatozoides por ml. de medio a las placas de fertilización durante el primer minuto posterior a su capacitación (para prevenir los cambios en el pH del medio que fue de 7.4) y se llevaron a la incubadora a 39° C, la cual se equilibró con 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, en un 100% de humedad relativa, cultivándose durante un período de 20 h.

3.6.3.4 Fertilización de ovocitos.

Después de la fertilización los ovocitos o presuntos zigotos fueron removidos de las gotas de fertilización y desnudados por el método de vortex. Para este momento los ovocitos tenían aproximadamente 18 a 20 h en las placas de fertilización. Para transferir los ovocitos fertilizados, se extrajeron de las placas de fertilización y se les hizo un lavado, se evaluaron y se cambiaron los ovocitos fertilizados a las placas de cultivo, se volvieron a colocar en la incubadora a 39°C, con 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, en un 100% de humedad relativa hasta completar 7 días.

Todas las gotas con los embriones fueron cubiertas con aceite mineral y cultivados por 8 días en atmosfera descrita anteriormente por pasos. El porcentaje de ovocitos que clivaron de 2 a 4 células fueron evaluados 42- 44 h posterior a la fertilización y el porcentaje de producción de blastocistos fue evaluado a los 8 días posteriores a la fertilización, mientras que la viabilidad de los embriones fue clasificada bajo observación estereoscópica y fueron los mismos clasificados como aptos o no aptos para la criopreservación.

3.6.4 Variables a analizar

- Cantidad y calidad de ovocitos por época de invierno y verano
- Competencia de ovocitos para convertirse en embriones
- Cantidad de embriones en invierno y verano

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se desarrolló el experimento con un diseño completamente al azar con el fin de determinar la eficiencia del proceso de fertilización in vitro en distintas épocas del año (verano e invierno). Previo al análisis se determinará la posible inclusión dentro del modelo de la cantidad de ovocitos como covariable.

Los datos se analizarán por un modelo lineal general, utilizando el paquete estadístico SAS v. 9.00 (2002).

5.- RESULTADOS

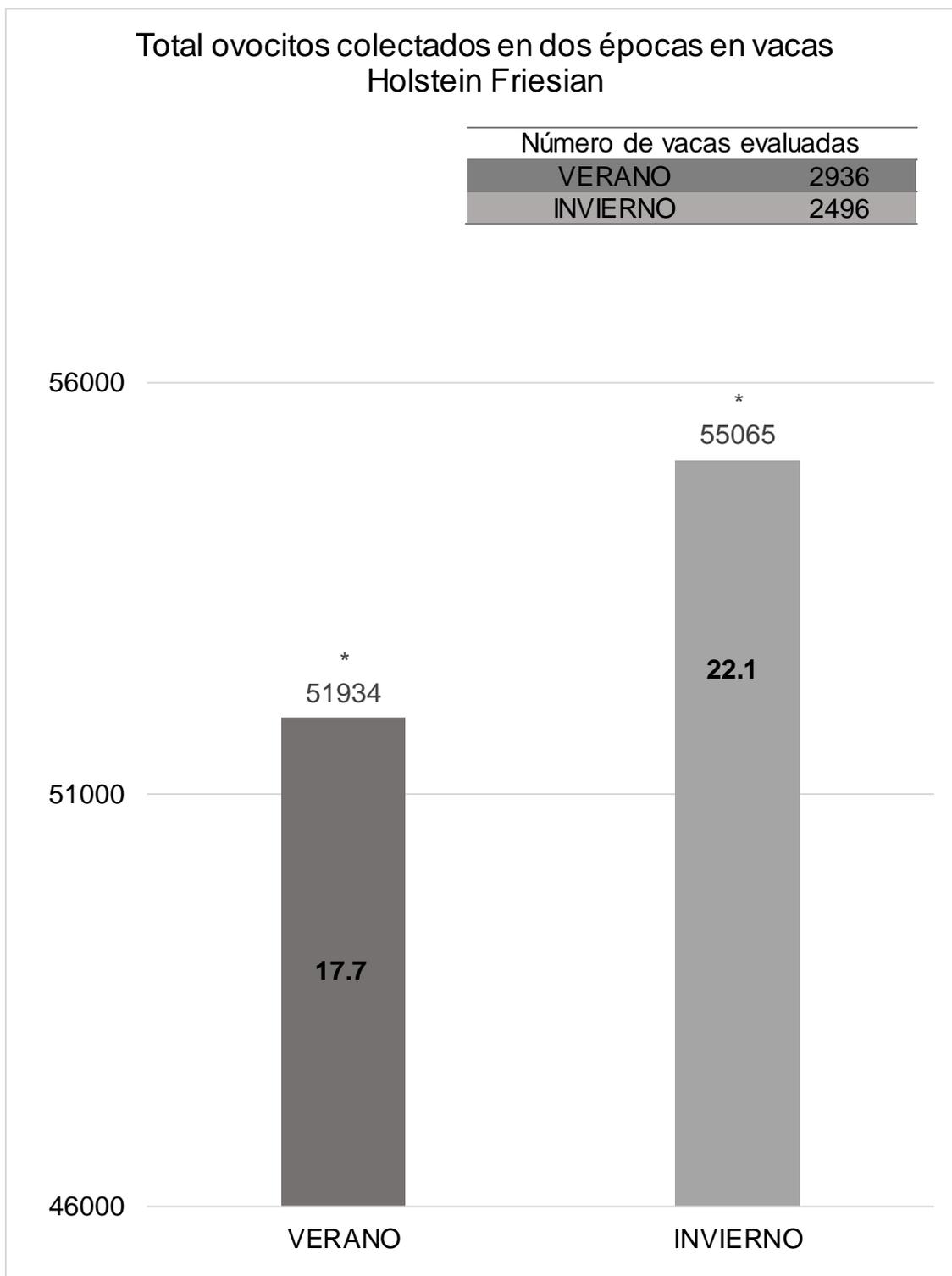


FIGURA 8. Total de ovocitos colectados en dos épocas en vacas Holstein Friesian.

* *Diferencia significativa entre columnas*

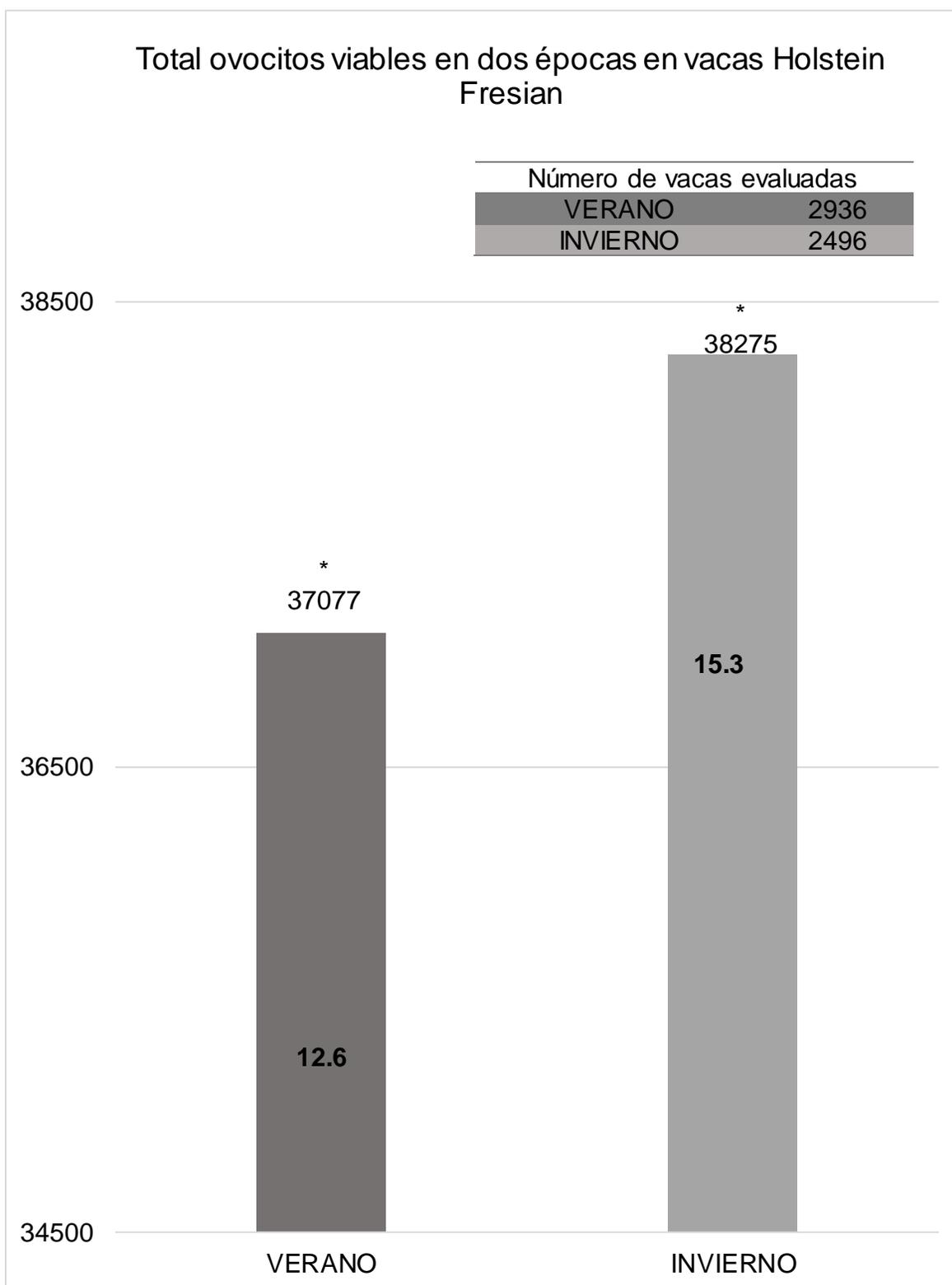


FIGURA 9. Total de ovocitos viables en dos épocas en vacas Holstein Friesian.

* Diferencia significativa entre columnas

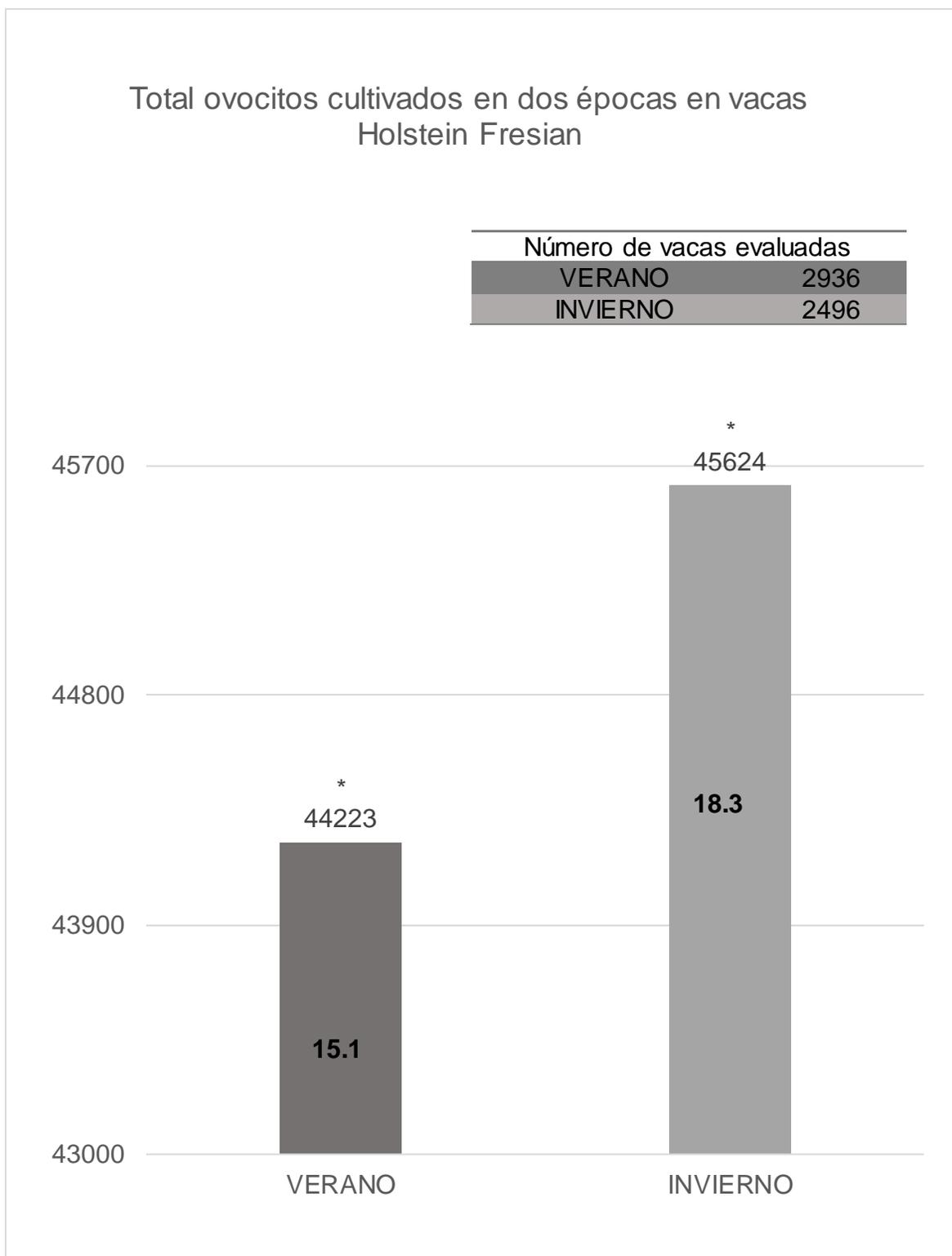


FIGURA 10. Total de ovocitos cultivados en dos épocas en vacas Holstein Friesian.

* Diferencia significativa entre columnas

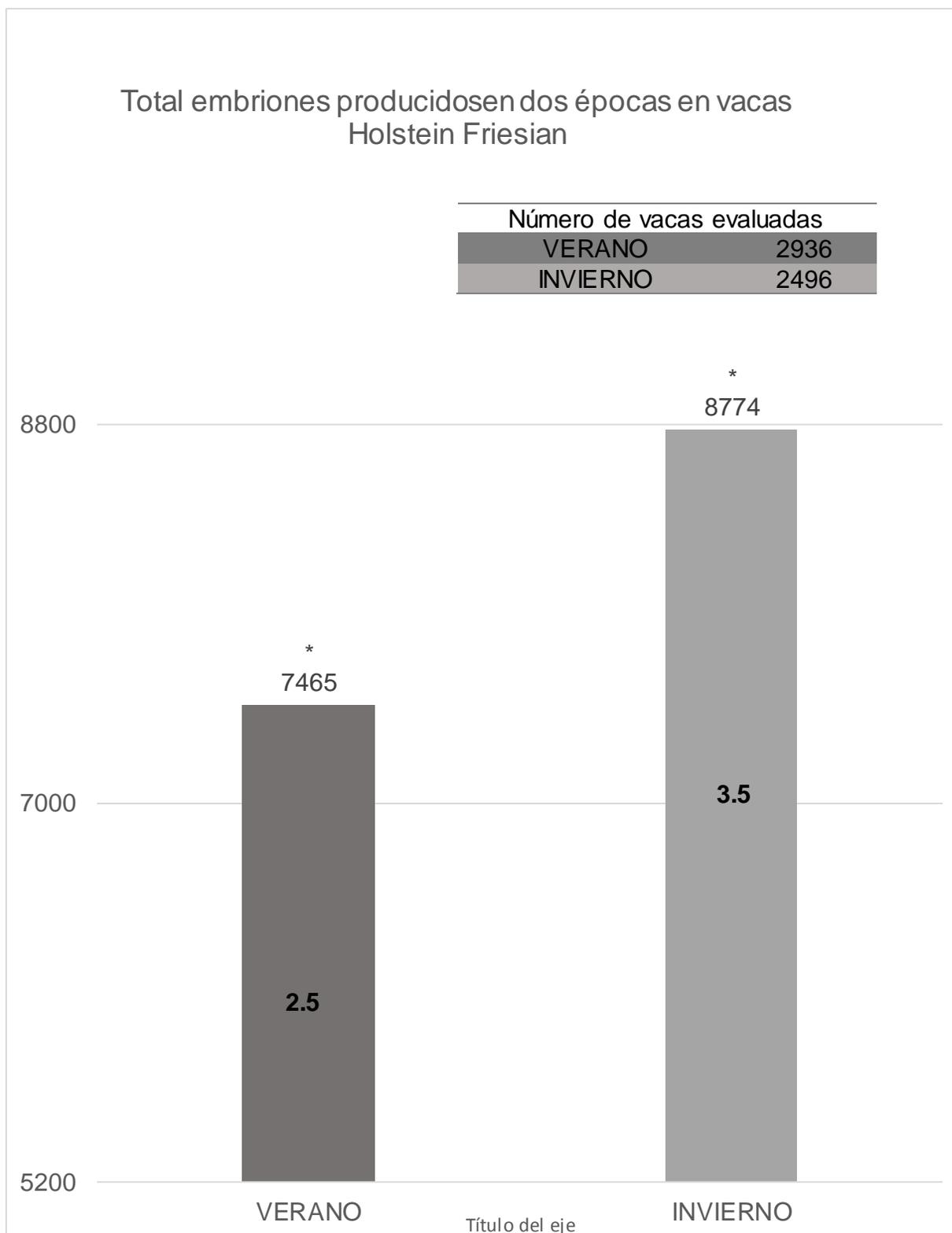


FIGURA 11. Total, de embriones producidos en dos épocas en vacas Holstein Friesian.

*Diferencia significativa entre columnas

6.- DISCUSIÓN

En la presente investigación se pudo demostrar el efecto de la época de calor en la eficiencia en la producción de embriones *in vitro* en la región semi árida de México conocida internacionalmente como Comarca Lagunera.

Como se pudo observar en la figura 8 la cantidad de ovocitos colectados en la época de frío fue mayor que el número de ovocitos colectados en la época de calor. Existen estudios sobre el estrés calórico y sus consecuencias en la dinámica folicular los cuales reportan que el tamaño de los folículos y la calidad de ellos se ve afectada en las vacas que son expuestas a altas temperaturas.

Los ovocitos necesarios para PIV son obtenidos de ovarios de matadero o de animales vivos utilizando para ello la aspiración transvaginal ecoguiada (OPU) (Herradón, Quintela, Becerra, Ruibal, & Fernández, 2007). Sin embargo, el porcentaje final de embriones transferibles obtenidos por estas biotecnologías es bajo, debido a la calidad variable de los ovocitos (Lonergan, Rizos, Gutierrez-Adan, Fair, & Boland, 2003).

La dinámica folicular es afectada por el estrés calórico, el efecto de dominancia decrece, ya que hay una emergencia temprana del folículo preovulatorio y carencia en la regresión de los folículos subordinados (Wolfenson et al., 1995).

El estrés calórico (EC) altera el desarrollo y la dominancia folicular durante los primeros ocho días del ciclo estral. Si este efecto se mantiene en forma crónica, la actividad de la aromatasa y las concentraciones de estradiol (E2) en el líquido folicular disminuyen (Badinga et al. 1993). Después de la ovulación, se afecta la producción de progesterona (P4) por el cuerpo lúteo (CL), se modifica el micro ambiente del oviducto y del útero, lo que compromete la sobrevivencia del embrión (Breuel et al. 1993)

El EC también actúa directamente sobre el ovocito y la función folicular, comprometiendo la calidad del mismo y promoviendo alteraciones de la dinámica folicular, afectando directamente la fertilidad en vacas lactantes; en estudios se ha

demostrado que la fertilidad puede variar según la estación del año, por ejemplo, en invierno disminuye cerca del 50%; en verano 20% y en el otoño es más baja que en el invierno. Se ha podido observar que en verano el 80% de los estros pueden ser indetectables. Además, se ha indicado que cuando las temperaturas rectales de los animales aumentan de 38.5 a 40°C en 72 horas después del servicio o la inseminación o transferencia de embriones, las tasas de preñez pueden disminuir hasta en un 50% (Castaño et al., 2014; Ambrose, 1999; Gilad et al., 1993; Ryan et al., 1992).

Se estima que los efectos del estrés calórico sobre la dinámica ovárica tienen consecuencias en el corto y largo plazo y que para que la dinámica ovárica se normalice deben pasar de 2 a 3 ciclos estrales desde la última afectación por calor (Roth, 2015).

Otros estudios en novillas y vacas han indicado que la disminución en la calidad del ovocito en el periodo temprano del posparto, está asociada con balance de energía negativo y las bajas condiciones corporales de los animales, lo cual se expresa en un aumento de embriones subdesarrollados y anormales, teniendo como consecuencia pérdida de embriones en los meses más calurosos del año (Wolfenson et al., 1997).

Varios son los factores que influyen en la calidad ovocitaria Morales (2017) demostró que, las vacas afectadas de mastitis clínica tienen un menor potencial para la producción de ovocitos ya que disminuye la producción de los de calidad G1 y se incrementa en ellas el número de ovocitos calidad G4 (descartados) y de acuerdo a la clasificación de grados en la calidad de ovocitos sugerida por De Loos et al. (1989), los grados G4 tienen menor condición para la producción de un embrión. En este mismo los propios criterios de selección se han tratado de homogenizar para evitar variabilidad en las calidades, Hansen (2001) menciona que para la selección de COCs generalmente se utilizan criterios morfológicos, que se basan en la evaluación del número de capas y compactación de las células del cúmulo oóforo; así como en la homogeneidad y tonalidad del citoplasma. Otra forma utilizada es la medición del diámetro ovocitario; lamentablemente, este método es

poco práctico, pues requiere la eliminación de las células del cúmulo, comprometiendo la viabilidad del ovocito. Varios estudios mencionan que para obtener ovocitos de buena calidad se debe aspirar folículos entre 4-8 mm, descartando los > 8 mm, sin embargo, no está claro si estos folículos podrían proporcionar ovocitos de buena calidad y en qué porcentaje.

La cantidad menor de ovocitos encontradas en este estudio en la época de calor pudiera explicarse debido a los fenómenos descritos en el proceso de estrés calórico como lo es disminución de los niveles de estradiol y gonadotropinas (Schreck,2001) los cuales podrían afectar el tamaño folicular y estos no ser visibles al momento de la aspiración por lo cual menos ovocitos fueron colectados .

Los efectos del estrés calórico también se evalúan durante el desarrollo embrionario temprano, para ello, es común el uso de modelos de producción de embriones *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, Hansen (2005) postula que los ovocitos en el folículo, la fecundación y los primeros dos días de desarrollo embrionario son sensibles al estrés calórico; al tercer y cuarto día el embrión adquiere cierta tolerancia, misma que aumenta al quinto día. Esto es reforzado por Edwards y Hansen (1997) quienes compararon el desarrollo embrionario en condiciones térmicas de 39 contra 41°C durante las etapas específicas de: dos células, 4-8 células y mórula compacta. No obtuvieron desarrollo de blastocitos al día 7 de los embriones estresados en etapa de dos células, obtuvieron un menor desarrollo de blastocitos al día 7 de los embriones provenientes del grupo tratado en la etapa de 4 a 8 células y la misma cantidad de blastocitos provenientes de los grupos tratados en el estadio de mórula. Sakatani et al. (2012a). encontraron resultados similares con la aplicación de un tratamiento de 40°C durante 24 horas en un cultivo de mórulas, el cual no tuvo ningún efecto adverso en el desarrollo de blastocitos mientras que sí hubo una disminución significativa en el porcentaje de blastocitos desarrollados cuando el mismo tratamiento se aplicó a nivel de cigotos.

Varios estudios han indicado que, en el ganado bovino, el desarrollo embrionario es altamente sensible a altas temperaturas, entre los primeros tres a 11 días después

del servicio; adquiriendo más tolerancia a altas temperaturas a medida que el periodo de gestación avanza. Se sabe que los embriones obtenidos mediante fecundación *in vitro* (FIV), son más susceptibles al estrés calórico que los obtenidos en condiciones naturales. La mayor pérdida de embriones de bovinos obtenidos de FIV, ocurren antes de los 42 días, cuando las hembras están bajo estrés calórico (Ambrose *et al.*, 1999; Ealy *et al.*, 1994).

7.- CONCLUSIONES

El estrés calórico causa disminución en la producción ovocitaria y embrionaria en las vacas Holstein en programas de PIV. Es un fenómeno en crecimiento de la mano con las tendencias de cambio climático reportadas. La afectación de la reproducción en la vaca debido al estrés calórico es multifactorial, es claro que el estrés calórico causa alteraciones en la dinámica folicular, perfiles hormonales, ambiente uterino y desarrollo embrionario temprano que finalmente disminuyen la fertilidad de la vaca.

8.- BILIOGRAFIA

Anderson, L.H. (1994), Day M.L. Acute progesterone administration regresses persistent dominant follicles and improves fertility of cattle in which estrus was synchronized with melengestrol acetate. *J. Anim. Sci.*; 72 p. 2955 - 2961.

Báez FJ, Chávez AC, Hernández HJ, Villamediana (2010) PC. Evaluación de la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Rev Cient*;20(3):259-67.

Biol. Reprod, Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes.. 35:850-857

Bondurant R. (1999) Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J. Anim. Sci.* 77, 101-110

Castaño FA, Rugeles CC, Betancur CA, Ramírez-López CJ. (2014) Impacto del estrés calórico sobre la actividad reproductiva en bovinos y consideraciones para mitigar sus efectos sobre la reproducción. *Revista Biosalud*

Castaño, F. A., Rugeles, C. C., Betancur, C. A., & Ramirez-López, C. J. (2014). Impacto del estrés calórico sobre la actividad reproductiva en bovinos y consideraciones para mitigar sus efectos sobre la reproducción. *Revista Biosalud*, 13(2), 84-94.

Chen, S., Lien, Y., Cheng, Y., Chen, H., Yang, Y. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws and grids. *Human reproduction*, 16:2350-2356.

Christensen BW, Drost M, Troedsson MHT. (2009). *Disease of the Reproductive System* En: Smith BP, ed. *Large animal internal medicine*. 4ta ed. USA. MosbyElsevier. p 1419-1483.

Collantes, J. (2011). Viabilidad de los ovocitos bovinos obtenidos post mortem, para la producción de embriones in-vitro. "Tesis previa a la obtención del título de Médico Veterinario". Universidad de Guayaquil Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Guayaquil, Ecuador.

Correa Romero, E. J., Cuichán, H., & Elizabeth, B. (2017). Evaluación de la calidad y cantidad embrionaria en respuesta a dos protocolos hormonales de superovulación en vacas girolando

Delgado, P. A. M., Cuéllar, N. R., Sánchez, C. M. G., & Rojas, E. C. C. (2011). Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Vet. zootec*, 5(2), 88-99.

Domínguez, R. R., Asprón-Pelayo, M. A., Vásquez-Peláez, C. G., González-Padilla, E., & Aréchiga-Flores, C. F. (2010). Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1(3), 189-203.

Filipiak, Y, Viqueira, M, & Bielli, A. (2016). Development and follicular dynamics from fetal life until puberty in cattle. *Veterinaria (Montevideo)*,

Földi J, Kulcsár M, Pécsi A, Huyghe B, de Sa C, Lohuis JACM, Cox P, Huszenicza G. (2006) Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Animal Reproduction Science* 96: 265-281.

Galina C., Valencia J. (2012) Reproducción de los animales domésticos, p. 70- 83.

GINTHER, O.J. (1996); Wiltbank, M.C.; Fricke, P.M.; Gibbons J.R.; Kot, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*; 55: 1187-1194.

Góngora, A., & Hernández, A. (2010). la reproducción de la vaca se afecta por las altas temperaturas ambientales high environmental temperatures affect reproduction in the cow. *Revista UDC A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(2), 141-151.

González J. (2013 junio) Análisis de programas y protocolos de preparación de hembras bovinas para realización de OPU en la obtención de ovocitos para FIV. In; Oviedo. p. 1-32

Herradón, P. G., Quintela, L. A., Becerra, J. J., Ruibal, S., & Fernández, M. (2007). Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos. *Arch Latinoam Prod Anim*, 15(1), 34-41.

KASTELIC J.P. (1991), Understanding ovarian follicular development in cattle. *Vet. Med.*; January. 60-70. C

Lamb, G.C., M.F. Smith, G.A. Perry, J.A. Atkins, M.E. Risley, D.C. Busch, and D.J. Patterson. (2009) Reproductive Endocrinology and Hormonal Control of the Estrous Cycle. North Florida, Research and Education Center, University of Florida.

Lewis GS. (1997). Uterine health and disorders. J Dairy Sci 80: 984-994.

LINARES, C., & HUMAYEL, I. E. (2014). EL EFECTO DEL ESTRES CALORICO EN BOVINOS DE LECHE.

LUCY M.C.; (1992) Savio D, Badinga L; De La Sota R.L.; Thatcher, W.W.; Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. J. Anim. Sci.; 70, p 3615 - 3626.

LUCY, M. C. (2001) Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End. J. Dairy Sci.; 84, p. 1277–1293.

MALDONADO J.M. (1997) Dinámica Folicular en Novillas y Vacas Bos indicus y Bos taurus. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 10, No. 2: 67-74.

Martínez Martínez, Y. (2013). Análisis de la morfología ovocitaria en bovino previa a FIV.

Molina-Coto, R. El estrés calórico afecta el comportamiento reproductivo y el desarrollo embrionario temprano en bovinos. Nutrición Animal Tropical, 11(1), 1-15.

Porras Almeraya Antonio I., Páramo Ramírez Rosa María. (2009) MANUAL DE PRÁCTICAS DE REPRODUCCIÓN

Ramos R. (2008) Avaliação de Estresse Térmico em Vacas Leiteiras Mestiças (Bos taurus x Bos indicus) Criadas em Clima Tropical Quente Úmido no Estado do Ceará. Dissertação Graduação, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Ceará;.

RHODES F.M.; (1995) De'ath G.; Entwistle K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. Animal Reproduction Science, Volume 38, Number 4, May, p. 265-277.

RHODES, F.M. (2002); Burke, C.R.; Clark, B.A.; Day, M.I.; Macmillan, K.L. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover 73 in postpartum anoestrus cows and cows which have resumed oestrus cycles. Anim Reprod Sci; 69, p. 139 – 150.

Samaniego Campoverde, J. X. (2017). Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up (OPU) en tiempos diferentes, luego de la estimulación ovárica con FSH-LH (Pluset®) en vaquillas criollas (Bachelor's thesis).

Sequeira MSc. Luis Toribio, (2013) COMPENDIO SOBRE REPRODUCCION ANIMAL

Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology 65: 1516-1530.

Schreck, C. B., W. Contreras Sánchez, M. S. Fitzpatrick 2001 Effects of stress on fish reproduction gamete quality, and progeny. Aquaculture, 197 3-24.