



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

**Efecto de la adición de dos proteínas ligadoras de heparina al semen
bovino congelado, en un programa de inseminación artificial en el
trópico.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

HORACIO ALVAREZ GALLARDO

TUTOR

Dr. SALVADOR ROMO GARCÍA

COMITÉ TUTOR

Dra. ALMA VIRGINIA LARA SAGAHÓN

Dr. MARIO PÉREZ MARTÍNEZ

Dr. ARMANDO ENRIQUE ESPERÓN SUMANO

Cuatitlán Izcalli, Edo. Mex.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

- A mis padres por todo el cariño y apoyo tanto moral como económico, sin ustedes nunca lo habría conseguido, porque este logro también es de ustedes, los amo y siempre serán mi ejemplo a seguir.
- A Florencia y Alejandro por tener siempre una palabra de aliento y por apoyarme en todo lo que ha estado en sus manos.
- A Sofía por darme tanta alegría, sin darte cuenta me has dado muchos motivos para continuar hacia delante.
- A Alejandra por ser parte de mi vida, por apoyarme y estar ahí, te amo.
- A José Manuel por apoyarme y tener siempre la palabra precisa, sabes que te admiro mi hermano.
- A mi gordo porque tus enseñanzas siempre están presentes y tu recuerdo me da muchas fuerzas, se que serias el primero en alentarme, siempre seré tu perro más fiel. †
- A Paula y Mario por apoyarme cuando más los he necesitado e impulsarme a seguir adelante.
- A Luis porque además de ser mi maestro, eres mi amigo, me has apoyado y siempre has confiado en mí.
- Al Dr. Javier Hernández por ser mi maestro, escucharme, aconsejarme, guiarme y apoyarme incondicionalmente.
- Al Dr. Carlos García por ser mi maestro y apoyarme siempre incondicionalmente.

PRESENTACIÓN

El presente trabajo forma parte del Proyecto Número 2009-004 del Programa de Apoyos de la Universidad de Texas A&M - Conacyt para la Colaboración en Investigación: Adaptation of Biotechnologies for Reproduction of Cattle in the Tropics (Adaptación de Biotecnologías para la Reproducción del Ganado en el Trópico). En esta investigación también se cuenta con el apoyo de la compañía comercial Sexing Technologies.

AGRADECIMIENTOS

- A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante mi formación académica.
- Al Programa de Apoyos de la Universidad de Texas A&M - Conacyt para la Colaboración en Investigación.
- Al Honorable Comité Académico del Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal por el apoyo económico para la impresión de tesis.
- Al Dr. Salvador Romo por ser mi maestro y guía durante mi formación.
- Al comité tutorial: Dra. Alma Virginia Lara Sagahón, Dr. Mario Pérez Martínez y Dr. Armando Enrique Esperón Sumano, por su contribución para mi formación.
- Al jurado: Dr. Fernando Osnaya Gallardo, Dr. Héctor Jiménez Severiano, Dr. José Cortés Zorrilla y Dr. Joel Hernández Cerón, por su revisión y comentarios sobre el trabajo.
- A los Drs. Thomas H Welsh, Jr. y Ronald D Randel, Profesores de la Universidad de Texas A&M, así como al Dr. Miguel Angel Lammoglia, Profesor de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana en Poza Rica-Tuxpan, por el apoyo brindado para lograr y llevar a cabo este proyecto.
- Al Sr. Juan F. Moreno, Director de Sexing Technologies, por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.
- Al Dr. Michael E. Kjelland, de Sexing Technologies, por la preparación del semen, apoyo técnico y bibliográfico, y por su participación activa durante la realización de este trabajo.
- Al Dr. Héctor Bernal por sus enseñanzas y apoyo incondicional durante la fase experimental.
- Al Dr. José de Lucas Tron por la asesoría y apoyo durante mi formación.
- Al Dr. Camilo Guzmán Dimas por su apoyo y enseñanzas.

- A la M. en C. Ana Delia Rodríguez Cortez por la medición de progesterona mediante la técnica de RIA.
- A la familia Bustamante León por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo, especialmente a la MVZ Karla Veronica Bustamante León
- A los trabajadores: Benito, Gustavo, Tino, Beto, Antolin, Juan Carlos y Gori, por todo el apoyo y esfuerzo durante este trabajo

RESUMEN

La disminución de la fertilidad en los machos tiene un impacto económico negativo en la producción de leche y carne en el ganado bovino. Por lo tanto existe interés en evaluar diversas proteínas que podrían aumentar la fertilidad de los espermatozoides. Este es el caso de las proteínas ligadoras de heparina (HBPs), específicamente el antígeno asociado a la fertilidad (FAA) y del inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 (TIMP-2), que actúan favoreciendo la capacitación y la reacción acrosomal, y modulan la respuesta del sistema inmune hacia los espermatozoides. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de adicionar FAA y TIMP-2 al semen bovino congelado sobre la fertilidad en un programa de inseminación artificial (IA). Para el experimento se utilizaron 100 vaquillas (*Bos indicus* x *Bos taurus*). Se seleccionaron en base a ciclicidad, condición corporal (CC) de 4 a 6 en una escala de 1 a 9, conformación anatómica evaluada por pelvimetría y anatomía genital (normal). La ciclicidad se evaluó mediante ultrasonografía de tiempo-real con un transductor lineal de 7.5 MHz. Los animales seleccionados presentaron al menos un folículo ≥ 8 mm y cuerpo lúteo. Se sincronizaron de la siguiente forma: Día 0: 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE), 500 μ g de cloprostenol (PgF2 α) y se insertó un dispositivo intravaginal con 1.38 gr progesterona (DIV); día 7: se retiró el DIV y se inyectaron 500 μ g de PgF2 α ; día 8 se inyectaron 0.5 mg de BE. Una vez detectado el celo se inseminaron formando 2 grupos al azar, de 50 animales cada uno. Los animales que no presentaron calor se inseminaron a tiempo fijo (IATF) de 52 a 56 h después del retiro del DIV. El grupo testigo se inseminó con semen convencional y el grupo HBP con semen al que se adicionaron FAA (25 μ g/ml) y TIMP2 (25 μ g/ml), ambos con una concentración 25×10^6 . Se realizó el diagnóstico de gestación por medio de ultrasonografía 45 días post IA. En el grupo testigo se obtuvo un 16% de gestación y en el grupo HBP 40%, con diferencia significativa ($P=0.0037$). Bajo las circunstancias antes mencionadas el semen HBP aumentó la fertilidad con respecto al semen testigo. Aunque los porcentajes de gestación no fueron los esperados, con el semen HBP se preñaron vaquillas de menor CC, lo que no ocurrió con el semen testigo. Se puede concluir que las HBPs aumentan la fertilidad y pueden ser una opción en el ganado bovino de trópico, aunque se debe considerar que el medio ambiente, la nutrición y la genética interactúan afectando el resultado final de cualquier programa reproductivo.

Palabras clave: HBP, FAA, TIMP2, Bovinos, Trópico, IATF.

ABSTRACT

A lowered fertility in males has a significant negative economic impact in beef and dairy cattle. Therefore there is an interest in evaluating different proteins which could increase sperm fertility. This is the case of heparin binding proteins (HBPs), specifically the fertility associated antigen (FAA) and the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, which help capacitation and acrosomal reaction, and modulate the response of the immune system to spermatozoa. The objective of this work was to determine the effect of adding FAA and TIMP-2 to bovine frozen semen on fertility, in an artificial insemination (AI) program in tropical beef cattle. For this experiment, 100 commercial heifers (*Bos indicus* x *Bos taurus*) were used. These were selected according to cyclicity, body condition score from 4 to 6 in a scale from 1 to 9, adequate anatomical conformation assessed by pelvimetry, and genital anatomy (normal). Cyclicity was evaluated by real time ultrasonography, with a 7.5 Mhz linear-array transducer. The selected animals had at least one follicle from ≥ 8 mm and a corpus luteum. They were synchronized as follows: Day 0: 2 mg estradiol benzoate (BE), 500 μ g cloprostenol (PgF2 α), and insertion of an intravaginal progesterone releasing device with 1.38 g of progesterone (DIV); day 7 DIV removal and an injection of 500 μ g PgF2 α ; day 8 an injection of 0.5 mg BE. After heat detection, heifers were randomly inseminated in two groups of 50 animals each. Those heifers not showing heat were artificially inseminated at a fixed time (FTAI) between 52 to 56 hours after DIV removal. The control group was inseminated with conventional semen and the HBP group with semen containing FAA (25 μ g/ml) and TIMP2 (25 μ g/ml), both with a sperm concentration of 25×10^6 . Pregnancy diagnosis was performed by ultrasonography 45 days after AI. The control group had a 16% pregnancy rate and the HBPs group 40%, showing a significant difference ($P = 0.0037$). Under the previously mentioned conditions, the semen with HBPs had an increased fertility rate when compared to the control semen. Although the pregnancy rates were not as expected, heifers with lower body condition were pregnant with the semen containing HBPs, and this was not the case with the conventional semen. It can be concluded that HBPs increase fertility and may be an option for tropical cattle, although it must be considered that factors as environment, nutrition and genetics can interact and influence the final outcome of any reproductive program.

Keywords: HBP, FAA, TIMP-2, Bovine, Tropic, FTAI.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Eventos fisiológicos en los espermatozoides	4
Transporte espermático	4
Capacitación espermática	5
Reacción acrosomal	7
Fluido oviductal	11
Plasma seminal bovino	12
Proteínas ligadoras de heparina	13
Sincronización del celo y la ovulación	20
Prostaglandina F2 alfa	20
Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y PgF2α	21
Progesterona y estrógenos	22
Crecimiento folicular ovárico	23
Ultrasonografía	26
MATERIAL Y MÉTODOS	29
Localización	29
Obtención del semen.....	29
Características del semen.....	29

Obtención del FAA y TIMP2	30
Adición del FAA y TIMP2.....	31
Preparación del diluyente	31
Dilución del semen	31
Empajillado y congelación del semen	32
Vaquillas	32
Criterios de inclusión	32
Ciclicidad	32
Condición corporal y conformación anatómica	33
Anatomía genital	33
Criterios de exclusión	33
Sincronización del celo y la ovulación	33
Detección de calores	34
Inseminación Artificial	34
Diagnóstico de gestación	34
Medición de progesterona sérica	34
Análisis estadístico	35
RESULTADOS	36
Retención de dispositivos intravaginales de P ₄	36
Presentación de calores e inseminación artificial	36
Medición de progesterona	36
Distribución de gestaciones	38
Primer servicio vs segundo servicio	38
Semen testigo vs semen HBP	38

Condición corporal baja vs condición corporal alta	39
DISCUSIÓN	41
Temperatura	41
Trabajos previos con semen congelado positivo a FAA.....	41
Presentación de calores y ovulación	41
Porcentaje de gestación	42
Niveles de progesterona	42
Estrés calórico	44
Balance energético negativo	46
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS DE ESTUDIO	50
BIBLIOGRAFÍA	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo del efecto de las HBPs en la capacitación espermática	9
Figura 2. Eventos moleculares durante la capacitación espermática y reacción acrosomal	10
Figura 3. Identificación del inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 (TIMP-2)....	16
Figura 4. Identificación del antígeno asociado a la fertilidad (FAA)	16
Figura 5. Espermatozoides atrapados en las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)	17
Figura 6. Localización por inmunofluorescencia del FAA y TIMP-2.....	19
Figura 7. Porcentajes de DIVs retenidos y presentación de calores de acuerdo a los diferentes grupos	36
Figura 8. Niveles de P ₄ en los días 14 y 16 post-inseminación	37
Figura 9. Vaquillas con niveles elevados y bajos de P ₄ sérica	38
Figura 10. Número de gestaciones de acuerdo al semen utilizado.	39
Figura 11. Relación de gestaciones en cuanto a la CC y el tipo de semen utilizado	40
Figura 12. Probabilidad de supervivencia del embrión de acuerdo a los niveles de P ₄	43

I. INTRODUCCIÓN.

La disminución de la fertilidad en los machos, tiene un impacto económico negativo en la producción de leche y carne en el ganado bovino (McCauley et al., 2001).

La inseminación artificial ha tenido un papel central en el mejoramiento genético del ganado. El uso generalizado de esta técnica y el logro de su completo potencial requiere de la preservación del semen por largos periodos. Aunque la criopreservación ayuda en el almacenamiento prolongado del semen, el proceso de criopreservación y descongelamiento, causa daños irreversibles al espermatozoide. Incluso con las mejores técnicas disponibles para la criopreservación, la supervivencia post-descongelado de la población de espermatozoides es aproximadamente del 50%. Por otra parte la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide es importante para una exitosa criopreservación, y es bien sabido que ocurren cambios bioquímicos y estructurales en la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de congelado y descongelado (Harshan et al., 2006).

La morfología y motilidad espermática, el número de espermatozoides por inseminación, el porcentaje de reacción acrosomal y la fertilización *in vitro* han sido ampliamente evaluados como indicadores de la habilidad del espermatozoide para fertilizar un óvulo (Moura, 2005). Las evidencias sugieren que el plasma seminal, el cual es una compleja mezcla de secreciones originadas de testículos, epidídimo y glándulas accesorias, contiene moléculas que modulan la habilidad del espermatozoide para fertilizar (Nauc y Manjunath, 2000). Estos estudios se basan en la comparación de la composición del plasma seminal de machos con diferentes niveles de fertilidad, o por la identificación de factores del plasma seminal que facilitan o inhiben la capacitación espermática, fertilización o eventos relacionados (Killian et al., 1993). Actualmente se están probando diversas

proteínas que probablemente aumenten la fertilidad de los espermatozoides, ya que actúan en algunos procesos previos a la fecundación, tal es el caso de las proteínas ligadoras de heparina (HBPs), específicamente el antígeno asociado a la fertilidad (FAA) y del (inhibidor tisular de metaloproteinasas 2) (TIMP-2), los cuales se ha visto que actúan favoreciendo la capacitación, reacción acrosomal y modulan la respuesta del sistema inmune hacia el espermatozoide (Kjelland et al., 2010).

El presente estudio se llevó a cabo con el propósito de contribuir en la búsqueda de nuevos métodos para aumentar la fertilidad de los bovinos mantenidos en condiciones de trópico húmedo, en este caso mediante la adición de HBPs al semen de bovino congelado.

II. HIPÓTESIS.

La adición de proteínas ligadoras de heparina; antígeno asociado a la fertilidad (FAA) y del inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 (TIMP-2) al semen bovino congelado utilizado en un programa de inseminación artificial mejora la fertilidad, aumentando el porcentaje de gestación en vaquillas.

III. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de adicionar FAA y TIMP-2 al semen bovino congelado, sobre la fertilidad de vaquillas, y compararlo con los resultados obtenidos con semen bovino congelado convencional, con el fin de conocer si estas proteínas pueden ser de utilidad para mejorar los programas reproductivos en bovinos de trópico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar mediante ultrasonografía la ciclicidad de las vaquillas para seleccionar a las que serán utilizadas.
2. Inseminar artificialmente a las vaquillas seleccionadas, usando semen congelado con y sin FAA y TIMP-2, comparando los porcentajes de gestación obtenidos con ambos grupos y en base a la condición corporal.
3. Determinar si las proteínas FAA y TIMP-2 pueden ser de utilidad para mejorar los porcentajes de gestación en bovinos de trópico.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA.

EVENTOS FISIOLÓGICOS EN LOS ESPERMATOZOIDES.

Transporte espermático.

Durante la eyaculación los espermatozoides salen del epidídimo y son transportados a través del ducto deferente y la uretra, donde se integran con el plasma seminal (Harper, 1994). Estos fluidos son producidos por las glándulas accesorias, en las que encontramos a las vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales y la ampolla (Manjunath et al., 2007). Las secreciones de estas glándulas tienen muchas funciones como limpiar la uretra de la orina residual previo a la eyaculación, proveer de una fuente de energía al espermatozoide e iniciar el proceso de maduración requerido para la fertilización. Hay muchas proteínas producidas por las glándulas accesorias que pueden estar presentes en el eyaculado (Harper, 1994).

El sitio de deposición de los espermatozoides difiere entre especies. En el bovino, durante la cópula, el semen es depositado en el segmento craneal de la vagina, muy cercano al orificio cervical. Sin embargo, cuando se utiliza la inseminación artificial (IA), los espermatozoides son depositados a nivel intrauterino evadiendo la barrera cervical (Rodríguez-Martínez, 2007). En la fase folicular del ciclo estral, el moco cervical se vuelve más abundante, cristalino, acuoso y más fácil de atravesar para el espermatozoide. Por el contrario, en la fase lútea bajo la influencia de progesterona este moco se vuelve escaso, opalescente, viscoso y consecuentemente no favorable para el paso del espermatozoide (Rutllant et al., 2005).

El proceso del transporte espermático a través del tracto genital de la hembra se puede dividir en tres fases: (a) transporte transuterino rápido, inmediatamente

después de la deposición del semen, (b) colonización del reservorio de espermatozoides y (c) lenta liberación del reservorio de espermatozoides hacia el sitio de fertilización en relación a la ovulación (Rodríguez-Martínez, 2007).

El oviducto de los mamíferos se divide anatómicamente en tres partes: istmo, ampulla e infundíbulo. Estas tres áreas están conectadas entre sí y también se les describe como unión útero-tubal (UUT), unión istmo-ampulla (UIA) y fimbria ovárica (FO). La histoarquitectura es muy simple, con una mucosa no glandular (endometrio), cubierta por un epitelio simple compuesto de células no ciliadas (secretoras), células ciliadas, con una doble capa de músculo liso (miometrio) y una cubierta serosa (mesometrio) continua con recubrimiento peritoneal. Esta histoarquitectura define la función de cada uno de los compartimentos del oviducto con una función específica; almacenamiento y preparación de gametos, fertilización y desarrollo del cigoto (Rodríguez-Martínez, 2007). La UUT sirve como barrera contra organismos infecciosos que puedan ingresar al oviducto provenientes del útero. También regula que espermatozoides pueden ingresar y cuando pueden hacerlo. El istmo funciona como un almacenaje de espermatozoides y el ampulla provee de un ambiente adecuado para que se lleve a cabo la fertilización y desarrollo embrionario temprano (Suárez, 2008; Rodríguez-Martínez, 2007; Olivera et al., 2006).

Capacitación espermática.

El espermatozoide tiene que someterse a cambios fisiológicos, capacitación y reacción acrosomal, antes de llegar a ser reproductivamente competente (Abou-haila y Tulsiani, 2009). Aunque se han encontrado espermatozoides en el oviducto después de pocos minutos de la inseminación, estos no son capaces de fertilizar, ya que no han tenido el tiempo requerido de capacitación. Estos cambios fisiológicos comienzan cuando el fluido seminal se une al espermatozoide y

concluyen con la reacción acrosomal y penetración de la zona pelúcida (Harper, 1994; Senger, 2003; McNutt y Killian, 1991).

La capacitación es el proceso por el cual la membrana plasmática del espermatozoide es alterada por la adición de ciertas proteínas del plasma seminal durante la eyaculación y después son removidas por otras proteínas de los fluidos del tracto reproductor de la hembra durante el transporte del espermatozoide. Es un evento gradual y prerrequisito esencial para la fertilización, la cual *in vivo* toma lugar durante la exposición secuencial del espermatozoide a los diferentes compartimentos del tracto genital de la hembra que ocurre durante el transporte espermático. Para alcanzar este estado en el espermatozoide eyaculado deben ser removidas proteínas del plasma seminal que se unieron a la superficie del espermatozoide, particularmente las proteínas de la región acrosomal (Lusignan et al., 2007; Rodriguez-Martinez, 2007; Olivera et al., 2006; Gadella, 2008). La capacitación, se caracteriza por la salida de colesterol de la membrana y por el ingreso de Ca^{++} y HCO_3^- al citosol (Theiren et al., 1998; Yanagimachi, 1994; Senger, 2003; Visconti, 1998; Breitbart, 2002; Olivera et al., 2006).

El fluido oviductal es rico en albuminas, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y glucosaminoglicanos (GAGs), capaces de retirar el colesterol de la membrana del espermatozoide, lo que la hace más fluida al producir la ruptura de la unión de las proteínas de fusión; estas últimas al quedar libres forman complejos de señalización de fusión de membranas (reacción acrosomal). La salida de colesterol durante la capacitación también induce la activación de los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje y de los canales de HCO_3^- , el ingreso de este al citosol, activa la adenilciclase dependiente de HCO_3^- que aumenta las concentraciones de AMP cíclico (AMPC), activando, a su vez, a la proteína quinasa A1 (PKA1); esta última fosforila algunas proteínas en los residuos de serina desencadenando la fosforilación de las tirosinas de otras proteínas citosólicas (Rodriguez-Martinez, 2007; Olivera et al., 2006; Leal et al., 2009) (Figura 1 y 2).

El espermatozoide tiene que someterse a la capacitación antes de que inicie la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1994). La capacitación puede requerir de varias horas, así los espermatozoides son transportados a través del cérvix, útero y oviducto. La capacitación no es un cambio terminal, mejor dicho es un proceso reversible, siempre que el espermatozoide sea reintroducido en el plasma seminal, lo cual iniciará la descapitación (Suárez, 2008; Souza et al., 2008; Manjunath et al., 2007).

Reacción acrosomal.

Después de la capacitación espermática, tiene que llevarse a cabo la reacción acrosomal para ser competente para la fertilización. El acrosoma está compuesto de una membrana acrosomal interna y otra externa. La reacción acrosomal inicia cuando se fusionan la membrana externa con la interna, creando vesículas que permiten la liberación del contenido acrosomal (Yanagimachi, 1994). La zona pelúcida expone glicoproteínas de reconocimiento que interactúan con la membrana del espermatozoide (Whitfield y Parkinson, 1992). Aquí se da la interacción proteína-proteína, con el receptor tirosina quinasa (TK) y con ZP3, una vez que interaccionan se activa el AMPc, el cual a su vez activa la PKA que provoca la apertura de canales de Ca^{++} voltaje dependientes en la membrana acrosomal externa (Olivera et al., 2006; Breitbart, 2002). Este pequeño incremento de Ca^{++} activa a la fosfolipasa C que se une a TK para inducir una ruta de señalización de PIP2 (Olivera et al., 2006; Senger, 2003; Arenas et al., 2010).

Cuando se da la interacción proteína-carbohidrato, el receptor unido a proteína G activa la fosfolipasa C, lo que induce la hidrólisis del fosfatidil inositol difosfato (PIP2) con generación de diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). El DAG activa la proteína quinasa C, lo que lleva a la apertura de un canal voltaje dependiente en la membrana plasmática y permite el ingreso de altas cantidades de Ca^{++} . El IP3 y la PKA abren un canal en la membrana acrosomal externa, lo

que lleva a la depleción del Ca^{++} en el espacio intraacrosomal, esto activa el canal de Ca^{++} “capacitante” en la membrana citoplasmática (Olivera et al., 2006; Abou-haila y Tulsiani, 2009). El receptor TK y la proteína G, pueden activar un intercambiador de $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ en la membrana plasmática, lo que alcaliniza el pH citosólico. El incremento de Ca^{++} regula su propia salida tanto en la membrana plasmática como en la acrosomal, mediante la activación de canales de Ca^{++} , dependiente de ATP, y con la activación de los intercambiadores $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$ (Navarro et al., 2008; Abou-haila y Tulsiani, 2009). La PKA fosforila los residuos de serina de las proteínas (PSP), estas a su vez, fosforilan los residuos de tirosina de las proteínas citosólicas que junto con el aumento del pH y Ca^{++} citosólico, permiten la fusión de membranas acrosomales, y de esta manera se produce la exocitosis del contenido enzimático del acrosoma (Olivera et al., 2006; Abou-haila y Tulsiani, 2009; Breitbart, 2002) (Figura 2). En el espermatozoide el acrosoma, contiene enzimas proteolíticas, las cuales son necesarias para la penetración de la zona pelúcida y la fertilización del óvulo. En la fracción enzimática se encuentra la proacrosina que es el precursor inactivo de la acrosina. Se ha encontrado que la acrosina ayuda en la unión del espermatozoide a la zona pelúcida (Ax et al., 1985).

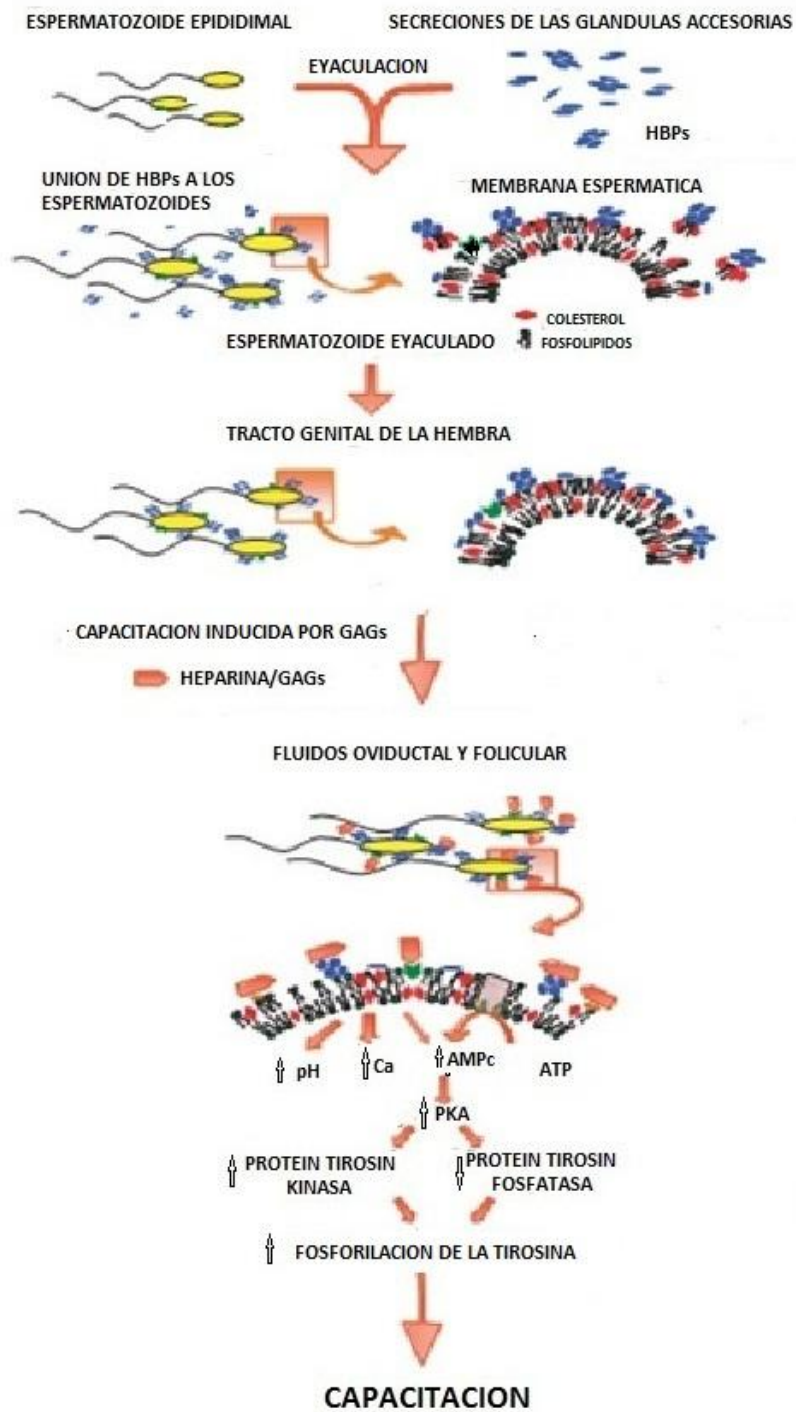


Figura 1. Modelo del efecto de las HBPs en la capacitación espermática (Adaptado de Manjunath et al., 2007).

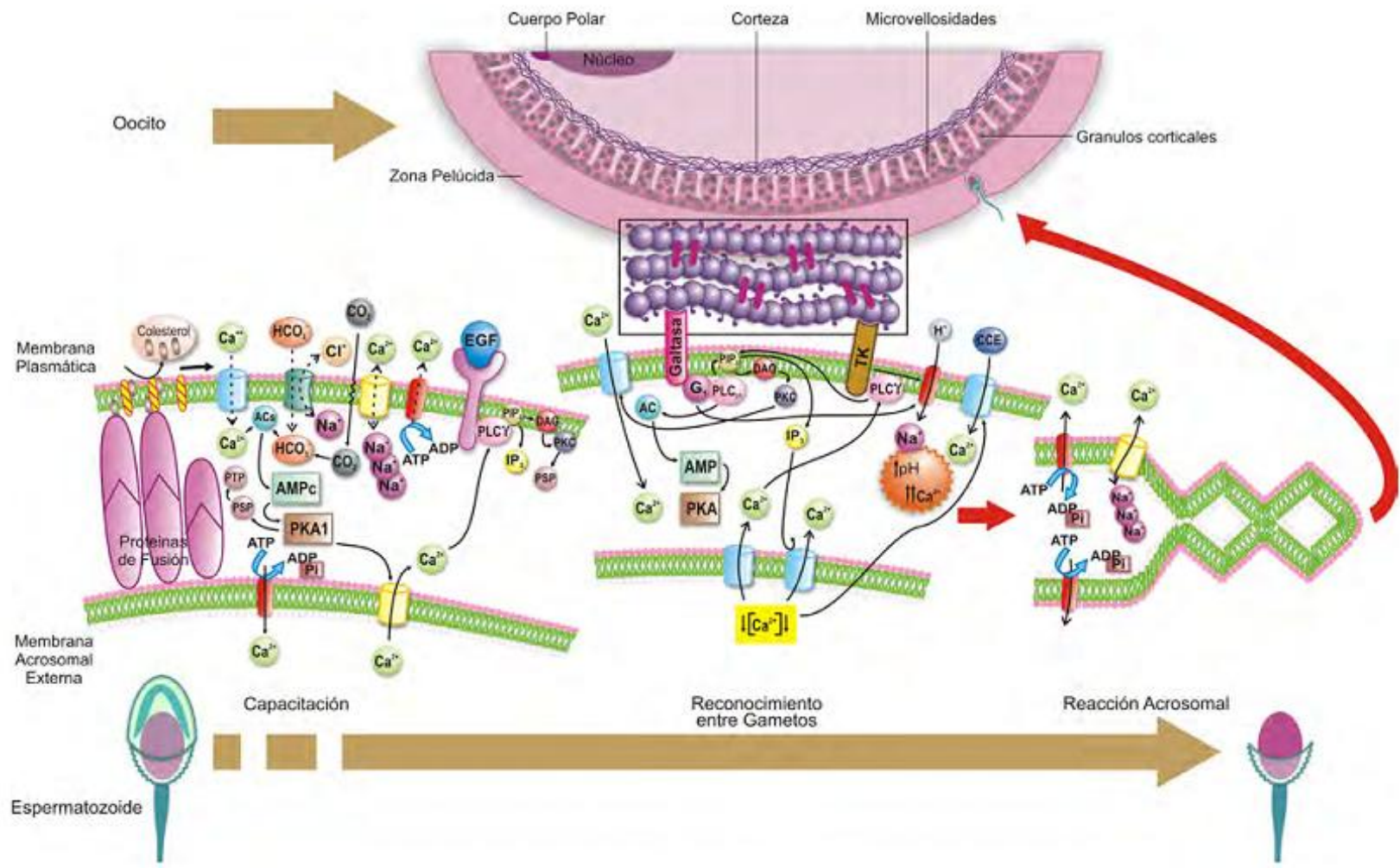


Figura 2. Eventos moleculares durante la capacitación espermática y reacción acrosomal (Olivera et al., 2006).

FLUIDO OVIDUCTAL.

El flujo de la secreción, el movimiento ciliar y las contracciones del miosalpinx, se encuentran involucrados en la formación y mezcla del fluido oviductal. (FOV), en este fluido es donde se da el contacto entre los gametos. El FOV se forma de secreciones específicas del epitelio (Rodríguez-Martínez, 2007), del fluido folicular (Theiren et al., 2005; McNutt y Killian, 1991), además de trasudación de la sangre a través de la lámina propia (principalmente en el segmento del ampulla), de esta manera el establecimiento de las diferencias regionales en la composición puede estar relacionado con el proceso de la preparación de los gametos para la fertilización. El FOV difiere del plasma sanguíneo en términos de composición iónica, pH, osmolaridad y contenido macromolecular. El pH es ligeramente alcalino (7.6), esto debido a sus niveles de bicarbonato que van de 35-90 mM, que son superiores a los niveles de la sangre venosa. El FOV varía en volumen y composición entre las diferentes especies y de acuerdo a la etapa del ciclo estral, siendo mayor el volumen durante el estro (Rodríguez-Martínez, 2007). Además el FOV es rico en proteínas, estas tienen pesos moleculares de 26, 29, 31, 45, 55, 60, 75, 84 y 135 kDa (Imam, 2008). Entre las proteínas más importantes encontramos a las glicoproteínas específicas del oviducto (OSG) u oviductinas, anexinas y a la osteopontina (OPN) (Rodríguez-Martínez, 2007; Igotz et al., 2007; Moura, 2005). El FOV también contiene glucosaminoglicanos (GAGs), los cuales se pueden dividir en no sulfatados (ácido hialurónico) y sulfatados (S-GAGs: condroitin sulfato, dermatan sulfato, keratan sulfato y heparan sulfato), estos últimos pueden ser aportados además por el fluido folicular, el cual es rico en heparan sulfato y condroitin sulfato. Los niveles y las concentraciones varían entre las diferentes regiones del oviducto y de acuerdo a la etapa del ciclo estral. Las concentraciones de S-GAGs son mayores en los bovinos además de que estas concentraciones son mayores en el ampulla que en el istmo (Rodríguez-Martínez, 2007).

Los GAGs del tracto reproductor de la hembra están involucrados en el proceso de capacitación y reacción acrosomal durante el transporte espermático hacia el sitio de fertilización (Ax et al., 1985).

Estudios *in vitro* han mostrado que la adición de heparina o componentes similares a la heparina como el condroitin sulfato a las muestras de semen facilita la capacitación y subsecuentemente la reacción acrosomal (Ax et al., 1985). Aunque la heparina no se encuentra en el tracto reproductor de la hembra, los GAGs están presentes en los fluidos folicular (bovino), oviductal y cervical, y estos componentes pueden facilitar la capacitación espermática y la reacción acrosomal en la hembra después de la inseminación natural y artificial. Se ha informado acerca de la potencia de los GAGs foliculares, concluyendo que mientras hubo interacciones fuertes entre los GAGs foliculares y las proteínas seminales, el heparan sulfato tuvo un mayor efecto sobre la capacitación comparado con el condroitin sulfato B (Thérien et al., 2005).

PLASMA SEMINAL BOVINO.

Los informes en muchas especies sugieren que el plasma seminal contiene factores que pueden influir en la fertilidad del macho. Estos estudios se basan en la comparación de la composición del plasma seminal de machos con diferentes niveles de fertilidad (Killian et al., 1993), o por el aislamiento de factores del plasma seminal que facilitan o inhiben la capacitación espermática, fertilización o eventos relacionados (Chandonnet et al., 1990; Souza et al., 2008), así como también se ha encontrado que suprimen la activación, quimiotaxis de neutrófilos y la fagocitosis de espermatozoides (Alghamdi y Foster, 2005).

Tres proteínas llamadas en conjunto proteínas BSP, BSP-A1/-A2, BSP-A3 y BSP-30 kDa representan las principales proteínas del plasma seminal bovino. En la eyaculación estas proteínas se unen a la superficie del espermatozoide e inducen

cambios moleculares en la membrana plasmática (Manjunath et al., 2007; Chandonnet et al., 1990).

Otras proteínas son las llamadas proteínas ligadoras de heparina (HBPs) estas tienen pesos moleculares que van de 14 a 31 kDa y se han clasificado en cinco complejos de acuerdo a su afinidad por la heparina (Miller et al 1990). De estas las más importantes son la proteína de 30 kDa (FAA) (McCauley et al., 1999) y la proteína de 24 kDa (TIMP-2) (McCauley et al., 2001). Al parecer las HBPs participan en la capacitación y modulación de la reacción acrosomal y han sido correlacionadas con la fertilidad en algunas especies, principalmente el bovino (Miller et al., 1990).

Por último la osteopontina (OPN) que en el bovino tiene un peso molecular de 41 kDa (isoformas van 14 a 55 kDa), y se le atribuyen efectos de adhesión celular, remodelación tisular, quimiotaxis de células inmunes, inhibición de la cristalización de oxalato de calcio principalmente (Moura, 2005; Souza et al., 2008).

PROTEÍNAS LIGADORAS DE HEPARINA.

En las últimas dos décadas ha sido importante el progreso en la identificación y caracterización de muchos componentes de las secreciones de las glándulas seminales, resultando en nuevas perspectivas con respecto al análisis del eyaculado de los animales domésticos (Fernandes et al., 2008).

Estudios recientes han mostrado que las proteínas del plasma seminal bovino (BSP) pueden modular las propiedades espermáticas (Manjunath et al., 2007).

Existe evidencia experimental que indica que los toros más fértiles producen espermatozoides con mayor afinidad por la heparina que los de toros menos fértiles. Se ha informado que los espermatozoides de toros con alta fertilidad

tienen una mayor frecuencia de reacciones acrosomales en respuesta a compuestos similares a la heparina y tienen mayor afinidad de unión por la heparina que los espermatozoides de toros menos fértiles (Bellin et al., 1994). La unión a la heparina se ha documentado en los espermatozoides de toro, conejo, mono, cerdo, cabra y humano (Miller et al., 1990).

La heparina es químicamente similar a otros azúcares conocidos como glucosaminoglicanos (GAGs) que son secretados en el tracto reproductivo de la hembra. La heparina y los GAGs del tracto reproductivo de la hembra se unen a proteínas en el espermatozoide bovino e inducen capacitación (Miller et al., 1990).

Tal vez el descubrimiento más significativo ha sido la participación de las proteínas ligadoras de heparina (HBPs) en la capacitación espermática y reacción acrosomal. Estas proteínas se han identificado en el bovino (Miller et al., 1990), la cabra (Ferreira et al., 2006), el perro (Kumar et al., 2008), el cerdo (Kraus et al., 2001) y en el humano (La Falci et al., 2001).

Estas proteínas han sido aisladas mediante geles (SDS-PAGE) (McCauley et al., 1999; McCauley et al., 2001; Chandonnet et al., 1990) y también se ha identificado su localización mediante el uso de anticuerpos monoclonales (Bellin et al., 1996; Ax et al., 2002). Este grupo de proteínas representan cinco clases de HBPs con pesos moleculares que van de 14-31 kDa (Miller et al., 1990). En toros Nellore se identificaron ocho HBPs con pesos moleculares que van de 15 a 63 kDa (Fernandes et al., 2008; Assumpção et al., 2005) y en búfalos también se identificaron 8 HBPs con pesos moleculares de 13 a 71 kDa (Arangasamy et al., 2005).

Se ha informado que la concentración promedio del total de HBPs en el plasma seminal bovino y membrana espermática es de 19.2 mg y 0.14 mg por mililitro de eyaculado, respectivamente (Nauc y Manjunath, 2000). Las HBPs son producidas

por las glándulas accesorias del macho y son secretadas dentro del fluido seminal. Se sabe que las glándulas accesorias de la rata macho (vesículas seminales, próstata y glándulas de Cowper) producen HBPs bajo el control de andrógenos (Nass et al., 1990). Las HBPs se unen al espermatozoide epididimal e incrementan su habilidad en la reacción acrosomal en respuesta a la heparina y a las proteínas de la zona pelúcida (Ax et al., 1985; Ax et al., 1987; Ax et al., 2002). Se ha propuesto que el potencial de fertilidad de los toros puede estimarse identificando HBPs en la membrana del espermatozoide (Bellin et al., 1996; Miller et al., 1990).

Las HBPs se combinan para formar complejos con cinco perfiles de afinidades por la heparina. El complejo con la mayor afinidad por la heparina, es conocido como HBP-B5. El complejo HBP-B5 está compuesto por múltiples proteínas (31, 24 y 14-18 kDa) (Miller et al., 1990). Se ha informado que los toros que tienen las proteínas de mayor afinidad por la heparina (HBP-B5), en las membranas de los espermatozoides, pero no en el fluido seminal fueron 17% más fértiles que los toros con otros perfiles de HBPs (Bellin et al., 1994; Bellin et al., 1998).

La determinación de la presencia del complejo HBP-B5 o como proteínas individuales en la membrana de los espermatozoides, aumentó la fertilidad de un 9 a 40% en toros Angus rojo, Gelbvieh, Santa Gertrudis y cruza (Santa Gertrudis x Gelbvieh) (Bellin et al., 1994). Dentro de este grupo se encuentran la HBP de 30 kDa llamada antígeno asociado a la fertilidad (FAA), y la HBP de 24 kDa la cual se identificó como inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 (TIMP-2) (McCauley et al., 1999; McCauley et al., 2001) (Figura 3 y 4). Spratt et al. (2000) obtuvieron un aumento en la fertilidad de 15.9% al inseminar vacas a calor natural y un incremento en el porcentaje de gestación del 16.3% en vaquillas con sincronización del estro, al utilizar semen de toros positivos a FAA.

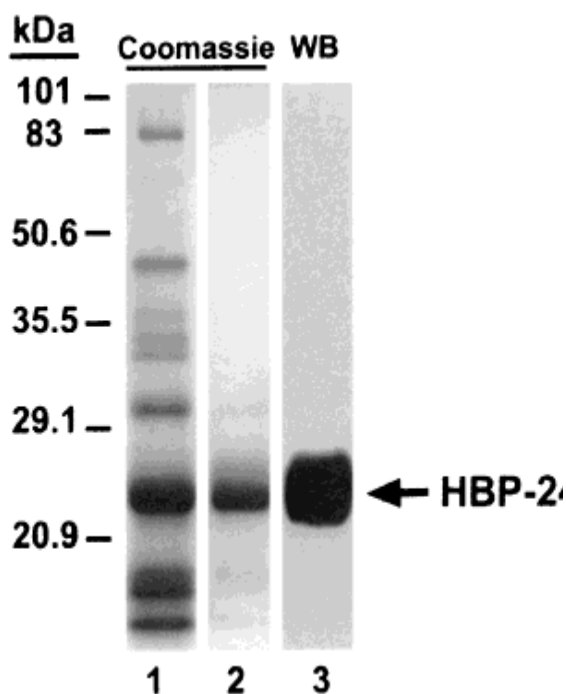


Figura 3. Identificación del inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 (TIMP-2) (McCauley et al., 2001).

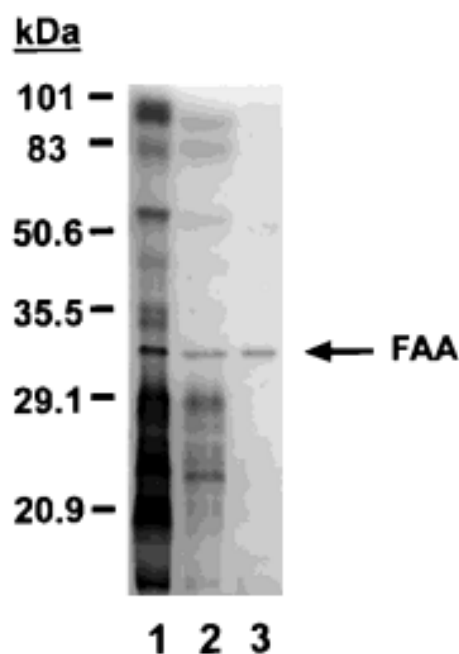


Figura 4. Identificación del antígeno asociado a la fertilidad (FAA) (McCauley et al., 1999).

La presencia del FAA (identificado como una DNasa-1) es un indicador de fertilidad superior de toros utilizados en inseminación artificial en pruebas de campo. Este se ha identificado en vesículas seminales y próstata, pero se detectó muy pocas veces en glándulas bulbouretrales (McCauley et al., 1999).

Se sabe que la proteína recombinante del FAA tiene actividad DNasa-1, y esta puede actuar sobre las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) de forma similar al factor de la proteína natural en el plasma seminal, esto basado en la investigación de Alghamdi y Foster (2005) (Figura 5). Brinkmann et al. (2004) demostraron un mecanismo de acción antimicrobiano por el que los neutrófilos activados exponen su DNA nuclear y proteínas asociadas (histonas) para formar NETs que capturan y eliminan microbios. Por otra parte Alghamdi et al. (2004) encontraron que el plasma seminal contenía una proteína factor o factores que

pueden reducir la unión de neutrófilos a los espermatozoides *in vitro* en forma dosis dependiente. Con base en lo reportado por Alghamdi y Foster (2005), la actividad DNasa (del FAA) presente en el plasma seminal digiere el DNA expuesto y libera a los espermatozoides atrapados, probablemente esto resulta en una mayor cantidad de espermatozoides que llegan al oviducto y de esta forma aumenta el índice de fertilidad (Kjelland et al., 2010).

Barrios et al. (2000) demostraron que la absorción de proteínas aisladas del plasma seminal puede reducir el daño por choque frío a la membrana espermática. Estudios preliminares con FAA recombinante indican que este estabiliza la membrana acrosomal del espermatozoide bovino, cuando el FAA se agrega antes de congelar el semen en un diluyente comercial (Kjelland et al., 2010).

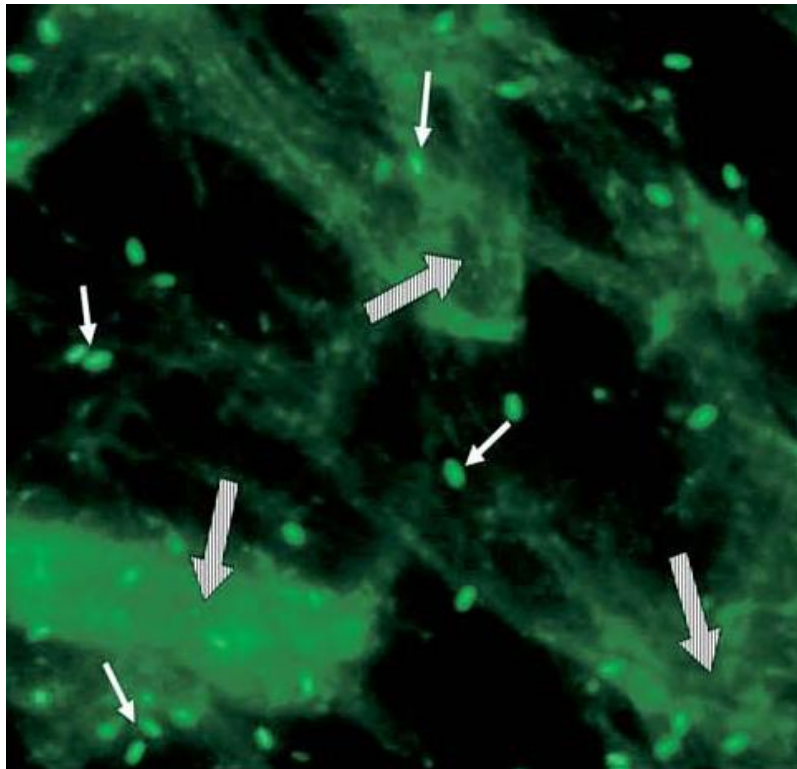


Figura 5. Espermatozoides atrapados en las trampas extracelulares de neutrófilos (Neutrophil Extracellular Traps NETs) (Alghamdi y Foster, 2005).

Mediante el uso de inmunofluorescencia indirecta en el espermatozoide bovino utilizando antisuero anti-FAA y un anticuerpo secundario de conejo anti cabra conjugado con FITC. Se ha demostrado la localización específica del FAA en el acrosoma del espermatozoide de toro (McCauley et al., 1996; Dawson, 2005) (Figura 6).

Respecto al TIMP-2, se identificó en vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales. El TIMP-2 actúa inhibiendo la actividad enzimática de las metaloproteasas (MMPs), dentro de las cuales se incluyen colagenasas intersticiales, gelatinasas, estromelinas y MMPs de membrana. Se sabe que la progelatinasa A (MMP-2) es inhibida específicamente por TIMP-2 (McCauley et al., 2001). Los toros con espermatozoides positivos a TIMP-2 fueron 13% más fértiles que los toros negativos a TIMP-2 (Bellin et al., 1994). De manera similar, en otro estudio de campo Mills (2002) encontró un 16% de mayores tasas de gestación cuando se utilizaron toros positivos a TIMP-2 en servicio natural (McCauley et al., 2001). Además se ha encontrado que el TIMP-2 se une a la región posterior del acrosoma (McCauley et al., 1996; Dawson, 2005) (Figura 6).

Por otra parte, se ha encontrado que las espermadhesinas del cerdo y la proteína DQH son proteínas ligadoras de heparina (Dapino et al., 2009; Kraus et al., 2001; Töpfer-Petersen et al., 1998).

Las HBPs del cerdo fueron detectadas como proteínas periféricas e integrales de la membrana periacrosomal por medio de microscopía de fluorescencia indirecta. Se detectaron dos diferentes patrones de fluorescencia, los cuales probablemente corresponden a espermatozoides capacitados y no capacitados (Dapino et al., 2009).

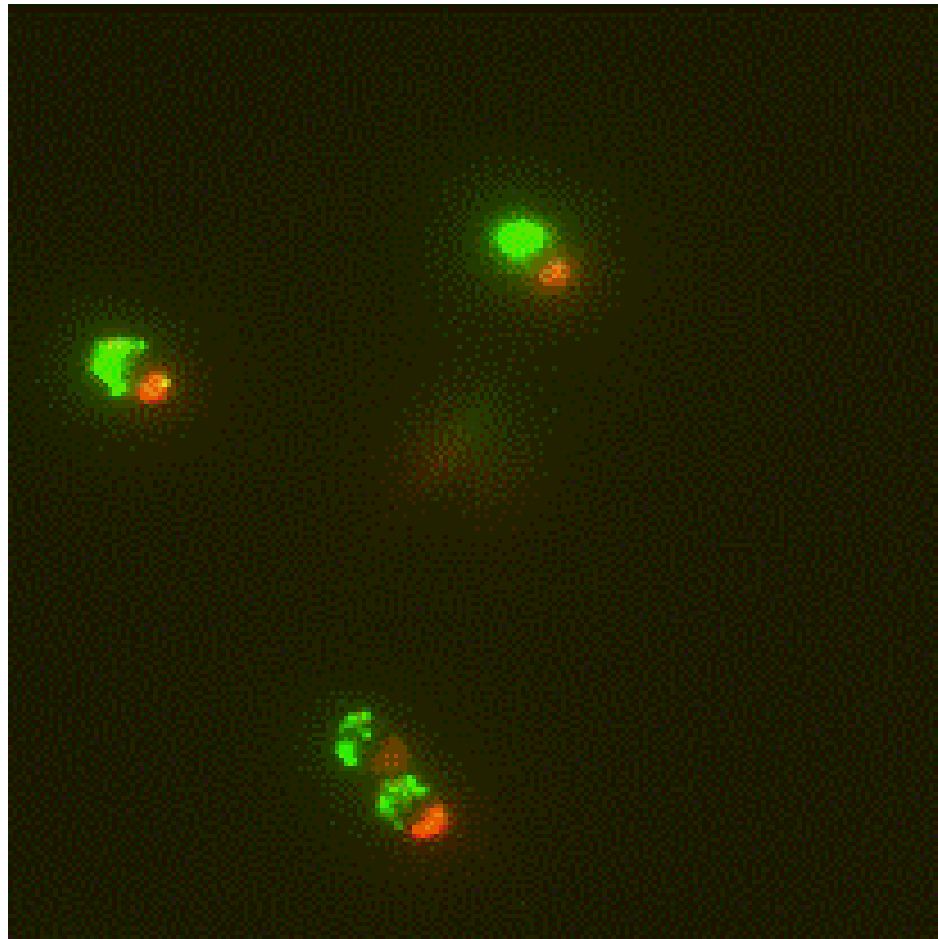


Figura 6. Localización por inmunofluorescencia del antígeno asociado a la fertilidad (FAA, verde) y del inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 (TIMP-2, rojo). (Kjelland et al., 2010).

En los espermatozoides de cerdo no capacitados las HBP se unen principalmente en la región post-acrosomal considerando que existe una previa permeabilización que sugiere que la heparina se une a los componentes de la membrana plasmática en la superficie del espermatozoide que están expuestos solo en la región post-acrosomal (Dapino et al., 2009).

Por otra parte se descubrió que las HBPs bloquean la llegada, activación y fagocitosis de PMNs en el tracto reproductor de la vaca (Alghamdi y Foster, 2005) y cerda (Rodríguez-Martínez et al., 2010).

SINCRONIZACIÓN DEL CELO Y LA OVULACIÓN.

La inseminación artificial (IA) es una de las técnicas reproductivas de mayor impacto en la producción ganadera. Sin embargo, la necesidad de observar el celo de 2 a 3 veces por día sin importar las condiciones climáticas, época del año y otras actividades que debe hacer el personal en una explotación ganadera hacen que se pierda eficiencia en esta actividad rutinaria y se comprometa considerablemente la eficiencia del sistema de producción. La modificación de los ciclos para que todas las hembras presenten celo en un periodo breve de tiempo es el objetivo que ha estimulado el desarrollo de numerosas líneas de investigación (Bó et al., 2006).

Los protocolos de sincronización se basan principalmente en el uso de prostaglandinas, GnRH, progestágenos y de estrógenos principalmente. La mezcla de estas hormonas han desarrollado diversos protocolos, entre los cuales los más conocidos son el uso prostaglandinas solas, prostaglandinas asociadas con GnRH, progestágenos asociados con GnRH y progestágenos asociados con estrógenos. (Martínez et al., 2000; Macmillan et al., 2003; Bó et al., 2003).

Prostaglandina F2 alfa.

La Prostaglandina F2 alfa ($\text{PgF}_{2\alpha}$) ha sido el tratamiento más comúnmente usado para la sincronización del estro en el ganado bovino. Sin embargo la presentación del estro se da en un periodo promedio de seis días, y está influenciado no solo por la respuesta del cuerpo lúteo (CL) al tratamiento de $\text{PgF}_{2\alpha}$, sino también al estado de desarrollo del folículo dominante al momento de aplicarla (Rodríguez,

2003). En ganado *Bos indicus*, incluso cuando la presencia de un CL ha sido confirmada al momento del tratamiento, la respuesta al estro fue 30% menor que la reportada para *Bos taurus*. En otros estudios se reportó que del 80 al 100% de las vacas tratadas con $\text{PgF}_{2\alpha}$ tuvieron regresión lútea, pero solo del 29 al 60% fueron detectadas en estro y el 51% ovuló dentro de los 5 días del tratamiento. La combinación de esta baja y variable respuesta al estro más el hecho de la gran incidencia de anestro es común en animales en pastoreo en trópico, esto explica la amplia variabilidad en la respuesta al estro y tasas de preñez después de tratamientos con $\text{PgF}_{2\alpha}$. (Bo et al., 2003).

Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y $\text{PgF}_{2\alpha}$.

La combinación de GnRH y $\text{PgF}_{2\alpha}$ ha sido exitosamente utilizada en protocolos de sincronización en ganado bovino de carne y leche. El protocolo más famoso es el llamado Ovsynch y consiste en una inyección de GnRH seguida por una inyección de $\text{PgF}_{2\alpha}$ 7 días después, continuando con una segunda inyección de GnRH 48 horas después de la aplicación de $\text{PgF}_{2\alpha}$ e Inseminar artificialmente a tiempo fijo (IATF) 15 horas después de la segunda inyección de GnRH. Este protocolo también ha sido utilizado para controlar el desarrollo folicular y para sincronizar la ovulación en ganado *Bos indicus* (Macmillan et al., 2003). La tasa de preñez después de la IATF no difiere de lo reportado para *Bos taurus* que va del 42 al 48%. En cuanto a vaquillas la tasa de preñez si fue muy variable para ganado *Bos indicus*, teniendo un rango de 21 al 43%. La razón de la pobre respuesta en vaquillas parece estar relacionada a la baja incidencia de ovulación del folículo dominante después de la primera inyección de GnRH, lo que resulta en una ineficiente sincronización del estro después de la segunda inyección de GnRH (Bó et al., 2003).

Progesterona y estrógenos.

Por más de 30 años, se habían realizado estudios para evaluar los diferentes tratamientos con progesterona (P₄) o progestágenos en varios esquemas de sincronización del estro. El uso de estradiol en combinación con P₄ o progestágenos se inició cuando se descubrió que el estradiol inducía regresión lútea. Durante los 90s se observó que el tratamiento con estradiol suprimía el crecimiento del folículo antral. La administración de 5 mg de estradiol-17β en implantes de progestágenos en ganado bovino, sincronizaban la emergencia de una nueva onda folicular en promedio de 4.3 ± 0.2 días después. Otros estudios evaluaron el efecto de diferentes esteres de estradiol sobre el desarrollo de la onda folicular. El valerato de estradiol (VE) a una dosis de 5 mg resultó en una predicción menos exacta de la emergencia de la onda folicular en vaquillas de razas especializadas en carne. Sin embargo la administración de benzoato de estradiol (BE) a una dosis de 2 mg por vía intramuscular en combinación con 50 mg de P₄ resultó en el inicio de una nueva onda de desarrollo folicular en 4.1 ± 0.1 días, con un rango de 3.5 a 5 días (Bó et al., 2003, Martínez et al., 2000).

Los tratamientos con estradiol y progestágenos han sido utilizados cada vez más en los últimos años en programas de sincronización del estro en ganado bovino. Actualmente existen dos tipos de dispositivos en el mercado, los implantes de la oreja con norgestomet y los dispositivos vaginales de liberación controlada de P₄ (Bó et al., 2003).

Actualmente, el uso de dispositivos intravaginales de liberación prolongada con P₄ y BE, es uno de los más populares tratamientos a nivel mundial para la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en ganado bovino de carne y leche. El tratamiento más común en ganado *Bos indicus* es muy parecido al utilizado en ganado *Bos taurus*. Este consiste en la administración de 2 mg de BE intramuscular en vacas y vaquillas al momento de aplicar el dispositivo de P₄ (día

0), aplicar $\text{PgF}_{2\alpha}$ intramuscular al retiro del dispositivo (día 7 u 8), e inyectar 1 mg de BE 24 horas después del retiro del dispositivo. El ganado es IATF entre 52 y 56 horas después de retirar el dispositivo (Bó et al., 2003).

Los resultados de mas experimentos en ganado *Bos indicus* demostraron que la aplicación de CIDR-B por un periodo de 8 días tuvo mayores tasas de preñez que en los tratamientos de 7 días. Sin embargo, en más estudios no encontraron diferencias significativas en las tasa de preñez en vacas *Bos indicus* x *Bos taurus* tratadas con CIDR-B por 7 u 8 días (Senger, 2003; Bó et al., 2003, Martínez et al., 2000).

CRECIMIENTO FOLICULAR OVÁRICO.

La naturaleza cíclica de la reproducción y las diferencias individuales existentes entre los animales, hizo que transcurrieran muchos años de discusión y controversia hasta definir la manera como se desarrollan y atresian los folículos durante el ciclo estral bovino. Recién a finales de la década de los 80s, trabajos donde se utilizó ultrasonografía de tiempo real documentaron convincentemente que el crecimiento folicular en el bovino ocurre en ondas. A estos primeros trabajos le siguieron otros que demostraron que el patrón de ondas se repite también en otros periodos de la vida del animal, como en el período prepúber, la preñez y periodo posparto (Bó, 2002; Gigli et al., 2006).

Una onda de crecimiento folicular en los bovinos implica el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos individualmente identificables a partir de un diámetro de 4 mm que ocurre al mismo tiempo en los dos ovarios. Durante aproximadamente 2 ó 3 días todos los folículos crecen, uno de ellos se selecciona y continúa creciendo hasta convertirse en folículo dominante, mientras que el resto de los folículos, llamados subordinados, se vuelven atrésicos y entran en regresión. La primera onda de desarrollo folicular se detecta el día de la ovulación (día 0) en los ciclos

de 2 ó 3 ondas. La segunda onda comenzará el día 9 ó 10 para los ciclos de 2 ondas y 1 ó 2 días más temprano (día 8 ó 9) en los ciclos de 3 ondas. En los ciclos de 3 ondas la tercera onda emerge en el día 15 ó 16. Estos patrones son valores promedio, ya que existe una gran variabilidad individual, especialmente en la segunda onda, que puede comenzar entre los días 6 a 12 en distintos animales (Bó, 2002; Bó et al., 2006). La duración del ciclo estral va a estar relacionada con la cantidad de ondas. El cuerpo lúteo (CL) comienza su regresión más temprano en los ciclos de 2 ondas (día 16) que en los de 3 ondas (día 19). Consecuentemente, la duración del ciclo de 2 ondas es de 18 a 20 días y dura de 21 a 23 días en el de 3 ondas. Se sabe que en el 95% de los ciclos estrales hay de 2 a 3 ondas de desarrollo folicular. En algunos animales *Bos indicus* se ha encontrado que pueden tener ciclos con 4 ondas, en este caso la cuarta onda comienza el día 20 ó 21 y el ciclo estral dura 24 ó 25 días. A pesar de que todos los factores que afectan el desarrollo folicular no han sido bien determinados, factores como el nivel nutricional, estrés calórico y estacionalidad pueden modificar el patrón de desarrollo folicular. Se ha encontrado que el bajo nivel nutricional está asociado a una proporción más alta de ciclos de 3 ondas y que hay una mayor proporción de animales *Bos indicus* con ciclos de 4 ondas en el otoño que en la primavera (Bó, 2002; Bó et al., 2006; Gigli et al., 2006).

El mecanismo que regula la dinámica folicular está basado en las diferentes respuestas de los folículos a FSH y LH. Se ha demostrado que hay incrementos de la concentración de FSH que comienzan 2 días antes del inicio de una onda folicular y llegan al pico máximo 1 día antes o el día de comienzo de cada onda. Otros trabajos también demostraron que alrededor del momento del celo hay 2 picos de FSH que son muy difíciles de diferenciar porque están muy cercanos entre sí. El primer pico de FSH ocurre al mismo tiempo que el pico preovulatorio de LH y es inducido por la liberación de GnRH desde el hipotálamo. El segundo pico ocurre cerca del momento de la ovulación y es aparentemente el responsable del reclutamiento de los folículos de la primera onda folicular (Bó et al., 2006).

Aún no se ha aclarado por completo el mecanismo de selección del folículo dominante. Mientras los perfiles de crecimiento del folículo dominante y los subordinados comienzan a diferenciarse, la FSH declina rápidamente, llegando a los niveles más bajos alrededor del día 2 cuando el folículo dominante alcanza 8.5 mm. En este momento, los niveles de FSH se encuentran por debajo de los niveles necesarios para el desarrollo de los folículos subordinados que se atresian, mientras el folículo dominante adquiere la habilidad de seguir creciendo con bajos niveles de FSH. La disminución de la FSH es producida por la inhibina, que es secretada por los folículos en desarrollo, y el estradiol-17 β que es producido principalmente por el folículo dominante (Bó et al., 2006; Bó, 2002). La razón por la que el folículo dominante puede crecer con bajos niveles de FSH mientras que los subordinados se atresian puede estar relacionada con la síntesis de receptores para LH en las células de la granulosa del folículo dominante. Todos los folículos poseen receptores de LH en las células de la teca y de FSH en las células de la granulosa. Los receptores de LH aumentan abruptamente a partir del día 4 de la onda, cuando el folículo dominante tiene más de 8 mm de diámetro (Bó et al., 2006; Bó, 2002). La LH se unirá a los receptores de las células de la granulosa estimulando una mayor producción de estradiol que le permitirá al folículo seguir creciendo aunque disminuyan los niveles de FSH circulante. Por esta razón se dice que el folículo dominante mayor de 8 mm es LH dependiente. La relación entre los niveles de LH y el crecimiento folicular también puede explicar el fenómeno de regresión del folículo dominante de las ondas anovulatorias y el comienzo de la próxima onda folicular (Bó et al., 2006; Bó, 2002). Los altos niveles circulantes de progesterona (P₄) producidos por el CL, disminuyen la frecuencia de pulsos de LH y causan la detención de las funciones metabólicas del folículo dominante. Este cese de la secreción de estradiol-17 β e inhibina se produce antes de que se observe una disminución del diámetro del folículo dominante, pero tiene como consecuencia el aumento de las concentraciones de FSH que va a reclutar los folículos de la siguiente onda folicular. Por el contrario, al ocurrir la luteólisis hacia el final del ciclo, hay un incremento de la frecuencia de los pulsos de LH que

estimula el crecimiento del folículo dominante y una mayor producción de estradiol-17 β , que induce los signos de celo y el pico preovulatorio de LH. También durante la gestación hay ondas foliculares pero las altas concentraciones de P₄ hacen que el diámetro máximo del folículo dominante disminuya progresivamente hasta llegar a un diámetro de 8.5 mm en el noveno mes de gestación (Bó et al., 2006; Bó, 2002).

ULTRASONOGRAFÍA.

La aplicación de la ultrasonografía transrectal de tiempo real como una herramienta de investigación para estudiar la reproducción bovina, representa un progreso tecnológico que ha revolucionado nuestro entendimiento de la biología reproductiva en el ganado. Estos descubrimientos incluyen dinámicas foliculares y ováricas, función de cuerpo lúteo y desarrollo fetal (Fricke, 2002).

Entre las aplicaciones prácticas del ultrasonido se incluyen: evaluaciones tempranas de gestación, identificación de vacas con gestaciones gemelares, detección de patologías ováricas y uterinas y determinación del sexo fetal (Quintela et al., 2006; Lamb, 2002; Fricke, 2002). Cada una de estas aplicaciones representa oportunidades para aumentar la eficiencia reproductiva en el ganado.

La mayoría de los ultrasonidos consisten en una consola que contiene las partes electrónicas, los controles, una pantalla en la cual es visualizada la imagen por el operador y un transductor, el cual emite y recibe ondas ultrasónicas de alta frecuencia. Los transductores de arreglo lineal consisten de una serie de piezas de cristales eléctricos arreglados en una fila. Estos cristales emiten ondas sónicas de alta frecuencia. La configuración de un transductor de arreglo lineal resulta en una imagen rectangular sobre la pantalla (Quintela et al., 2006; Fricke, 2002; Lamb, 2002).

Los órganos reproductivos del bovino son más comúnmente escaneados por vía rectal usando un transductor de arreglo lineal. Los transductores de arreglo lineal más comúnmente utilizados en la práctica reproductiva de bovinos tienen un rango de frecuencias de 5 y 7.5 MHz, la mayoría de los ultrasonidos son compatibles con estos transductores. La profundidad de penetración del tejido de las ondas sónicas y la resolución de la imagen es dependiente e inversamente relacionada con la frecuencia del transductor. De esta forma tenemos que los transductores de 5 MHz tienen mayor profundidad de penetración del tejido, pero menor detalle de imagen, mientras que el transductor de 7.5 MHz tiene menor profundidad de penetración al tejido, pero mayor detalle de imagen. Un ultrasonido con transductor de 5 MHz es de más utilidad para la práctica reproductiva en bovinos en evaluaciones reproductivas de rutina, sin embargo las estructuras ováricas pequeñas (desarrollo de folículos) son mejor evaluadas con un transductor de 7.5 Mhz (Quintela et al., 2006; Fricke, 2002; Hanzen et al., 2000).

Las estructuras llenas de fluido, como los folículos, se observan como estructuras circulares negras (anecoicas) rodeadas por tejido ovárico ecogénico (Quintela et al., 2006). La mayoría de los ultrasonidos de uso veterinario pueden visualizar folículos ováricos con un diámetro de 2 a 3 mm o mayores y los folículos grandes pueden ser seguidos durante varios escaneos seriales (Hanzen et al., 2000; Fricke, 2002).

El cuerpo lúteo aparece como áreas distintivamente ecogénicas dentro del estroma ovárico. Muchos cuerpos lúteos aparecen como una masa sólida de tejidos, pero puede también contener cavidades llenas de fluido (Quintela et al., 2006).

En la práctica profesional se ha comprobado que para realizar un buen diagnóstico de gestación es necesario haber observado dilatación del cuerno uterino con contenido de líquido, membranas fetales, embrión y latido cardíaco. El embrión se

observa como una masa blanca en medio de líquido y las membranas fetales aparecerán como una línea blanca que rodea al embrión; al principio de la gestación esa línea suele ser discontinua, pero a medida que avanza la gestación se puede ver rodeando por completo al embrión (Lamb, 2002). La eficacia en la detección de la gestación después del día 26 post-inseminación va de un 87.7% al 97.7% de confiabilidad. Cuando el diagnóstico de gestación se realiza entre los días 21 al 25 la eficacia varía de un 44.8% al 82.3%. Aunque el diagnóstico de gestación se puede realizar de forma precoz se deben de tener muchos cuidados para asegurar la eficacia del diagnóstico (Fricke, 2002).

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

Localización.

El presente estudio se llevó a cabo del 16 de mayo al 3 de julio del año 2010 en el estado de Tabasco, México, situado en la región del trópico húmedo de México, y que está localizado con latitud norte 17°59' y latitud oeste 92°56' con una altitud de 10 m sobre el nivel del mar. El clima es cálido y húmedo con abundantes lluvias en verano (Aw1). La temperatura media es de 33.6°C y la precipitación pluvial anual es de 2,237 mm (Enciclopedia de los Municipios de México, 2005).

Las vaquillas con las que se realizó el estudio se manejaron bajo pastoreo extensivo y fueron suplementadas con sales minerales (Super-bayphos®) de manera rutinaria. Las especies forrajeras incluyeron zacate pangola (*Digitaria decumbens*) y zacate camalote (*Paspalum spp*). Las vaquillas se dividieron en dos grupos (50 cada uno) y se alojaron en dos potreros de 10 Ha cada uno, a 200 metros del corral de manejo, provistos de agua y sombreaderos durante los 9 días del programa de IA. Los sementales no tenían acceso a estos potreros.

Obtención del semen.

La colección del semen se realizó por medio de vagina artificial (previamente desinfectada) a una temperatura inicial de 43-46 °C (Sorensen, 1979).

Características del semen.

- Motilidad mínima $\geq 55\%$
- Anormalidades primarias $\leq 15\%$
- Anormalidades secundarias $\leq 15\%$
- Anormalidades totales no mayor a 25%

- Motilidad progresiva a la hora 0 post-descongelación $\geq 45\%$
- Motilidad progresiva a las 3 horas post-descongelación $\geq 30\%$
- Acrosomas intactos a las 3 horas post-descongelación $\geq 50\%$
- Concentración de 25×10^6 espermatozoides por pajilla de 0.5 ml
- Se utilizó microscopía de campo claro para todas las pruebas de motilidad
- La evaluación de integridad del acrosoma y morfología espermática se realizó con microscopía diferencial de interferencia de contraste (DIC).

Obtención del FAA) y del TIMP-2.

El presente estudio forma parte de un proyecto de colaboración entre la Universidad de Texas A&M, la compañía comercial Sexing Technologies[®] y la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM. El semen con y sin proteínas ligadoras de heparina (HBPs) fue preparado y congelado por la compañía Sexing Technologies[®].

El FAA y el TIMP-2 fueron proporcionados por la compañía Sexing Technologies[®].

Para la obtención del FAA, se clonó en *E. coli* mediante un vector de expresión altamente inducible, un fragmento de 592 pares de bases a partir del cDNA del FAA, correspondiente a los residuos de aminoácidos 73 a 269 de la proteína original (Lenz et al., 2000).

Para la obtención del TIMP-2 se realizó el aislamiento de RNA total a partir de las vesículas seminales de bovino, con el cual se realizó RT-PCR, la clonación, detección y el análisis de la secuencia del producto obtenido. Como resultado, se obtuvo un fragmento de 650 pares de bases del gen TIMP-2 bovino, el cual corresponde al 96% de este gen completo y comprende todos los codones de la secuencia de aminoácidos esperada para la proteína TIMP-2 (Zhang, 2001).

Adición del FAA y del TIMP-2.

Se agregaron 25 µg de FAA y 25 µg de TIMP-2 por mililitro de semen, se dejaron reposar 20 minutos a ~21 °C, posterior a esto se procedió con la dilución, empajillado y congelación.

Preparación del diluyente.

El diluyente se ajustó a un pH de 6.80 y a una osmolaridad de ~300±5 mOsm. La formula es la siguiente:

COMPOSICIÓN DEL DILUYENTE DE SEMEN UTILIZADO

COMPONENTES QUÍMICOS	CANTIDADES
TRIS	7.57 g
Ácido cítrico monohidratado (CAM)	4.32 g
FRUCTUOSA	2.25 g
Yema de huevo	50 ml (20% v / v)
Glicerol	15 ml (6%)
Tilosina	100 µg/ml
Gentamicina	500 µg/ml
Lincomicina-Espectinomicina	300/600 µg/ml
Agua nanopura 18.2 MilliQ	Aforar a 250 ml

Dilución del semen.

La dilución se realizó a 50×10^6 espermatozoides por ml ó 25×10^6 espermatozoides por pajilla de 0.5 ml.

Empajillado y congelación del semen.

El semen con y sin las proteínas ligadoras de heparina (HBPs) utilizadas en el presente estudio se obtuvo de un mismo toro (raza Brahman) y de un mismo eyaculado. El semen fue empajillado con el equipo “straw filler” de Minitube®. Para el semen testigo se utilizaron pajillas de color verde y para el semen con HBPs se utilizaron pajillas de color azul. La congelación del semen se realizó con un equipo “Digital programmable semen freezer”.

Vaquillas.

Para el experimento se utilizó un grupo de 100 vaquillas comerciales, adaptadas a un clima tropical, con influencia de genotipos *Bos indicus* y *Bos taurus*. A partir de estos animales se formaron dos grupos; las vaquillas del grupo testigo (n=50) fueron inseminadas con semen sin adicionarle HBPs y las vaquillas del grupo HBP (n=50) fueron inseminadas con semen al que se adicionaron las HBPs (FAA y TIMP-2).

Criterios de inclusión.

Las vaquillas se seleccionaron tomando en cuenta su ciclicidad, condición corporal (CC), peso, conformación anatómica y anatomía genital.

Ciclicidad.

La actividad ovárica se evaluó mediante ultrasonografía de tiempo-real (modo-B) con un transductor lineal de 7.5 MHz y los animales seleccionados presentaron al menos un folículo ≥ 8 mm y cuerpo lúteo (Cutaia et al., 2010; MacNeil et al., 2006; Perry et al., 2006).

Condición corporal y conformación anatómica.

Se seleccionaron animales con condición corporal (CC) de 4 (promedio de 320 kg) a 6 (promedio de 350 kg) en una escala de 1 a 9 donde 1 es muy delgada y 9 es obesa (Herd y Sprott, 1986). La conformación anatómica se evaluó mediante pelvimetría (Gene, 1992; Patterson y Herring, 1998; Anderson y Bullock, 2000).

Anatomía genital.

Se seleccionaron animales con anatomía genital normal en lo referente a presencia de ovarios, cuernos uterinos, cérvix y vulva, mediante evaluación por palpación transrectal.

Criterios de exclusión.

Hembras con anomalías anatómicas, anéstricas y/o con condición corporal de 3 o menor.

Sincronización del celo y la ovulación.

Las vaquillas se sincronizaron para la presentación del estro, de la siguiente forma: Día 0: Se inyectaron vía intramuscular (IM) 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE), 500 µg de cloprostenol ($\text{PgF}_{2\alpha}$) y se insertó un dispositivo intravaginal con 1.38 gr de progesterona (DIV); día 7: se retiró el dispositivo y se administraron IM 500 µg de cloprostenol ($\text{PgF}_{2\alpha}$); día 8: se inyectó IM 0.5 mg BE (Bó et al., 2003; Cutaia et al., 2010).

Detección de calores.

La detección de calores se llevó a cabo por medio de observación directa, complementándola marcando la base de la cola con crayón de color. El marcado se realizó el día 8 de la sincronización al momento de inyectar la segunda dosis de BE. La observación de calores se inició de las 6 a las 7 pm del día 8 de sincronización y a las 5:00 am del día 9 de sincronización, durante una hora. Se inseminó primero a los animales que no presentaban la marca del crayón (Rae, 2002), esto debido en clima tropical la presentación de calores se da entre las 6 pm y las 6 am principalmente (Galina y Orihuela, 2007). Los animales que no se identificaron en celo se inseminaron a tiempo fijo de 52 a 56 h después del retiro del dispositivo.

Inseminación artificial.

Las vaquillas se inseminaron por la técnica rectovaginal formando 2 grupos al azar de 50 animales cada uno. El Grupo testigo se inseminó con semen bovino congelado sin HBPs y el Grupo HBP se inseminó con semen bovino congelado al que se le adicionó 25 µg/ml del antígeno asociado a la fertilidad (FAA) y 25 µg/ml del inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2).

Diagnóstico de gestación.

El diagnóstico de gestación se efectuó por medio de ultrasonografía de tiempo-real (modo-B) con un transductor lineal de 7.5 MHz a los 45 días post inseminación.

Medición de progesterona sérica (P₄).

Una vez inseminadas las vaquillas, se tomaron al azar 15 de ellas (sin importar si eran del grupo testigo o tratado) para obtener una muestra de sangre para medir

la concentración de P₄ en suero los días 14 y 16 post inseminación, esto con el fin de conocer los niveles de P₄ durante el periodo de reconocimiento materno de la gestación (grupo de animales monitores o de referencia). De estas muestras se eliminaron 2 (tanto del día 14 como del 16) debido a la presencia de hemólisis.

Las mediciones de P₄ se agruparon en niveles bajos y altos. Se consideraron niveles bajos aquellos inferiores a 1 ng/ml y los niveles altos fueron los superiores a 1 ng/ml.

El coeficiente de variación intraensayo fue de 5.88.

La determinación de P₄ se realizó por radioinmunoanálisis y se utilizó el kit TKPG1 de SIEMENS® para radioinmunoensayo de progesterona en fase sólida, que tiene como marcador ¹²⁵I y la lectura se efectuó en un contador de radiación gamma (Oakfield instrument, Inglaterra).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En ambos grupos (tratado y testigo) se evaluaron los porcentajes de retención de DIVs, presentación de calores, eficacia del protocolo de sincronización (evaluada de acuerdo a la presentación de calores), gestación al primer servicio y gestación de acuerdo a la condición corporal. Para analizar la retención de DIVs, presentación de calores y el porcentaje de gestación a primer servicio se utilizó la Prueba Z para diferencia de proporciones. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar las gestaciones de acuerdo a la CC. Los niveles de P₄ sérica se evaluaron con la prueba T para diferencia de medias.

VI. RESULTADOS.

Retención de dispositivos intravaginales de P₄ (DIVs).

El porcentaje de DIVs retenidos tanto para el Grupo A como el Grupo B fue del 100% (Cuadro 1).

Presentación de calores e inseminación artificial (IA).

En la presentación de calores el Grupo testigo tuvo un 96% y el Grupo HBP tuvo un 92% sin mostrar diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.19$), la información se presenta en el cuadro 1. La IA se realizó de 24 a 26 h después de la segunda inyección de BE, o 48 a 50 h después del retiro del dispositivo.

Cuadro 1. Porcentajes de DIVs retenidos, presentación de calores de acuerdo a los diferentes grupos.

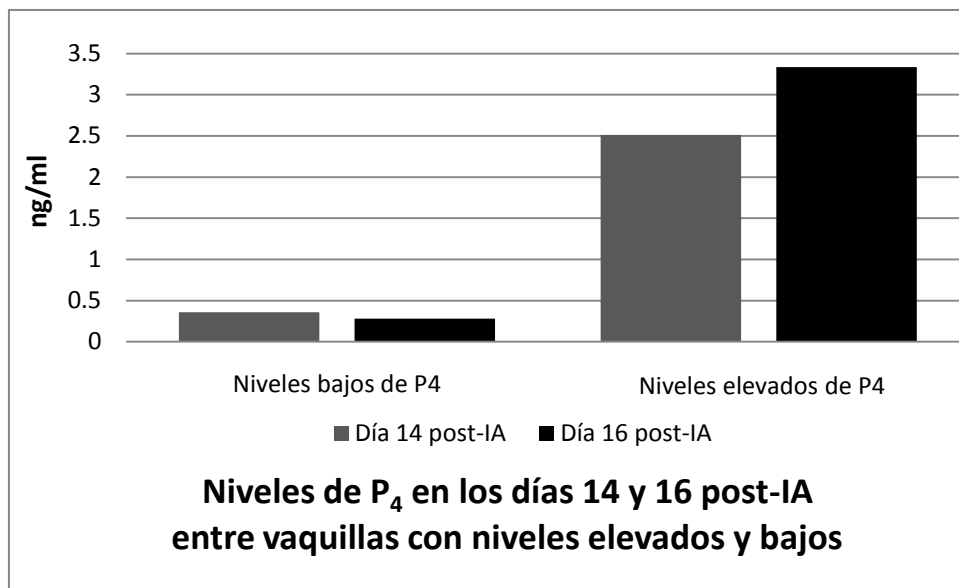
GRUPO	VAQUILLAS (n)	DIVs RETENIDOS	PRESENTACIÓN DE CALORES*
GRUPO TESTIGO	50	50 (100%)	48 (96%)
GRUPO HBP	50	50 (100%)	46 (92%)

*($P = 0.19$)

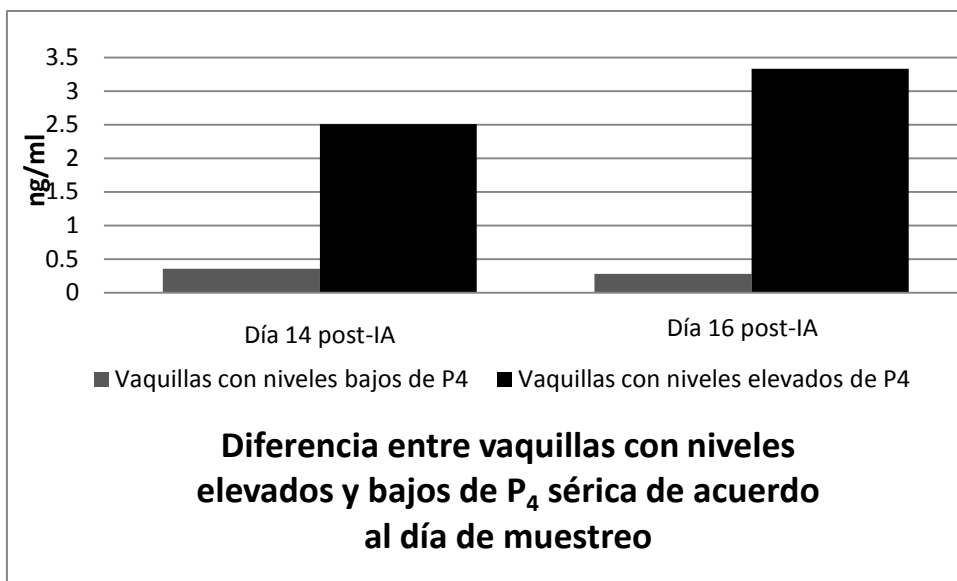
Medición de progesterona (P₄).

De las 13 muestras, solo una correspondió a una hembra que posteriormente se diagnosticó como gestante, sin embargo los resultados de medición de P₄ durante los días 14 y 16 post-inseminación muestran niveles elevados de P₄ en 6 animales. El día 14 post-IA los animales con niveles elevados de P₄ tuvieron una concentración promedio de 2.51 ng/ml de P₄ sérica y el día 16 post-inseminación presentaron una concentración promedio de 3.33 ng/ml de P₄ sérica. Estos

resultados muestran un incremento en los niveles del día 14 al 16 post-IA, sin haber diferencia significativa entre los promedios de ambos días (Gráfica 1). En los animales con niveles bajos, el día 14 post-IA tuvieron una concentración promedio de 0.357 ng/ml de P₄ sérica y el día 16 post-IA su concentración promedio fue de 0.282 ng/ml. Estos niveles muestran un decremento del día 14 al 16 post-IA, sin haber diferencia significativa entre los promedios de ambos días (Gráfica 1). Al comparar los resultados de los días 14 y 16 post-IA entre los animales con niveles elevados y niveles bajos se observa una diferencia significativa entre ambos grupos (Gráfica 2).



Gráfica 1. Niveles de progesterona en los días 14 y 16 post-inseminación.



Gráfica 2. Vaquillas con niveles elevados y bajos de P₄ sérica. Día 14 post-IA (P<0.05); Día 16 post-IA (P<0.05).

Distribución de gestaciones.

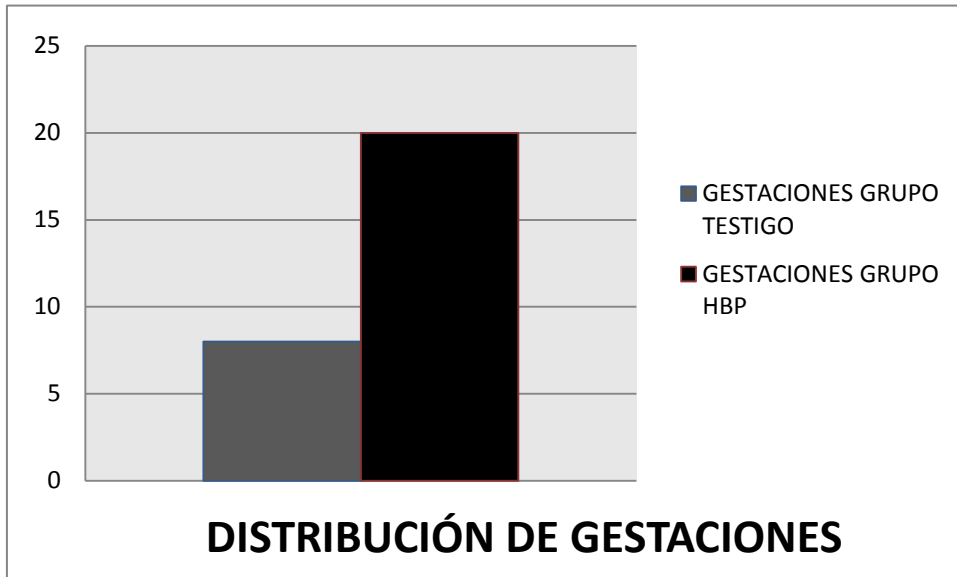
Primer servicio vs segundo servicio.

El porcentaje de gestación total al primer servicio fue de 28% (28/100), el porcentaje de gestación total al segundo servicio fue del 81% (17 de 21 animales que repitieron calor). Para el segundo servicio se utilizó semen convencional sin HBPs, por lo que estos datos no se tomaron en cuenta en este experimento. El porcentaje de gestación al final del programa fue de 45%.

Semen testigo vs semen HBP.

En los grupos testigo y HBP los porcentajes de gestación fueron de 16% (8/50) y 40% (20/50) respectivamente, mostrando una diferencia significativa (P = 0.0037),

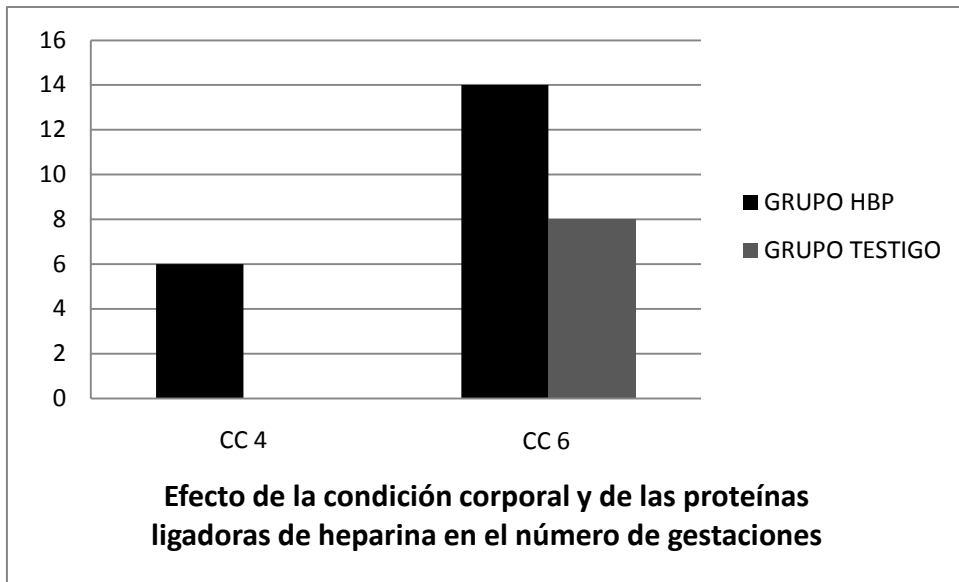
con un intervalo de confianza al 95% límite inferior -0.0703 y límite superior -0.4096. Estos resultados se presentan en la Gráfica 3.



Gráfica 3. Número de gestaciones de acuerdo al semen utilizado (P=0.003).

Condición corporal baja vs condición corporal alta.

En cuanto a la condición corporal (CC) de las 28 vaquillas gestantes, 6 presentaron una CC de 4 y las 22 restantes se encontraban con una CC de 6, siendo esta diferencia significativa (P<0.05). Los resultados se presentan en la Gráfica 4.



Gráfica 4. Relación de gestaciones en cuanto a la CC y el tipo de semen utilizado CC 4 ($P = 0.073$); CC 6 ($P = 0.01$).

VII. DISCUSIÓN.

Temperatura.

Durante la realización de este trabajo, la temperatura ambiental fue elevada. El servicio meteorológico nacional reportó para los meses de mayo, junio y julio la temperatura máxima de 35.5 °C para el estado de Tabasco (Servicio Meteorológico Nacional, 2010). Considerando que no se reportan los datos específicos para Villahermosa, pero sabiendo que la capital es de las partes más cálidas del estado, es posible inferir que los promedios de temperatura máxima en las zonas cercanas a Villahermosa pudieron ser de ≥ 40 °C.

Trabajos previos con semen congelado positivo a FAA.

En esta investigación el grupo HBP fue 24% más fértil que el grupo testigo, lo cual es mayor a lo reportado por Sprott et al. (2000) quienes obtuvieron un incremento en el porcentaje de gestación del 16.3% en vaquillas con sincronización del estro, al utilizar semen congelado de toros positivos a FAA. Aunque ellos obtuvieron un 62% de gestación, en este experimento se obtuvo un 40%. Esta diferencia puede deberse a que su muestra fue mayor y a que ellos utilizaron semen de toros positivos solo a FAA y en este trabajo se utilizó semen al que se le agregó FAA y TIMP-2 producidos por ingeniería genética. Hasta el momento no se encontraron referencias sobre otros trabajos de este tipo.

Presentación de calores y ovulación.

En el presente estudio la presentación de calores ocurrió entre las 12 y 14 horas posteriores a la administración de la segunda inyección de BE, por lo que la IA se realizó a las 24-26 horas posteriores. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Randel (citado por Bó et al., 2003) donde encontró que en vaquillas cruzas de

Brahman X Hereford ovularon 22.2 ± 2.6 horas después de la aplicación del BE. Sin embargo, no corresponde a lo reportado por Rocha (citado por Bó et al., 2003), donde encontró que el intervalo del inicio del estro a la ovulación fue de 27.6 ± 5.1 horas utilizando el sistema Heat-Watch en vaquillas *Bos Indicus* x *Bos taurus*.

Por otra parte, se ha informado que la exposición a agentes estresantes afecta la frecuencia y amplitud de pulsos de GnRH y LH y retarda la onda preovulatoria de LH con un subsecuente decremento en la expresión del estro e incidencia de ovulación normal (Bó et al., 2003). Por lo tanto las altas temperaturas durante la realización de este trabajo pudieron haber influido en forma negativa en la ovulación de las vaquillas.

Porcentaje de gestación.

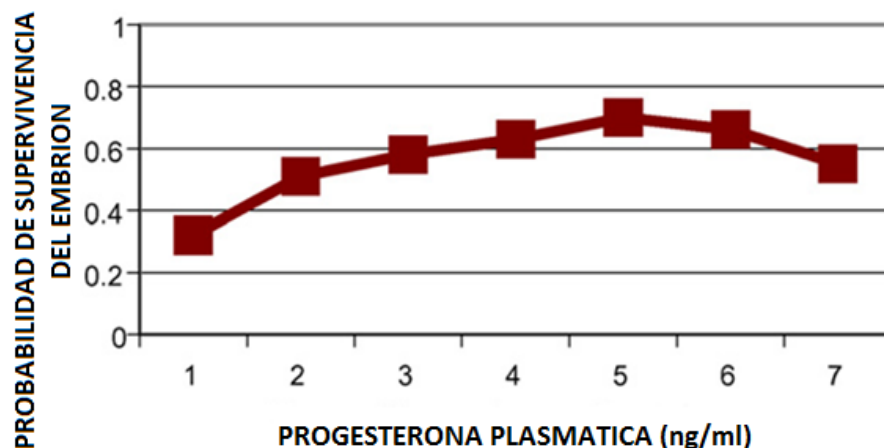
El presente estudio se efectuó en los meses de mayo a julio del 2010. El porcentaje de gestación al primer servicio fue de 28%. Este resultado es similar a lo reportado por Bo et al (2003), quienes encontraron porcentajes de gestaciones del 28.7% al 66.9% en vacas y vaquillas tratadas con DIB y BE e IATF de 26-32 horas después de retirar el DIB. En otro trabajo, en 1984 Randel (citado por Bo et al., 2003) reportó mayor porcentaje de gestación en verano (61%) que en otoño (36%) en ganado Brahman, siendo estos porcentajes superiores a nuestros resultados. Esta diferencia se puede deber a que Randel utilizó vacas en lugar de vaquillas y además utilizó únicamente ganado de raza Brahman.

Niveles de progesterona (P₄).

Respecto a la concentración de progesterona que presentaron las vaquillas con altos niveles de P₄, nuestros resultados muestran un promedio de 3.33 ng/ml en el día 16 post-inseminación y son cercanos a lo reportado por Thirapatsukun et al.

(1978), quienes encontraron concentraciones de 2.52 ng/ml en animales gestantes el día 17 post-inseminación. Con base en la concentración sérica de P₄ encontrada al día 16 es probable que en ese momento algunas de estas vaquillas estuvieran gestantes y que posteriormente presentaron reabsorciones embrionarias y/o abortos. Esto pudo haber sido debido a las altas temperaturas que se presentaron en la temporada en que se realizó el estudio, y que son atípicas de la región. Por otra parte, Bó et al. (2003) informaron de la existencia de concentraciones menores de P₄ para el ganado *Bos indicus*, en comparación con *Bos taurus*, pero no indican los niveles exactos. Lo anterior puede indicar que los niveles de P₄ que se obtuvieron en este trabajo pueden ser indicativos de gestación.

Por otra parte Diskin et al. (2006), en vaquillas de carne demostraron que existe una asociación lineal y cuadrática similar entre las concentraciones periféricas de P₄ y supervivencia del embrión. En este estudio midieron las concentraciones plasmáticas de progesterona en vaquillas de carne en pastoreo en el día 7 post-inseminación, encontrando que con concentraciones de 1 ng/ml la probabilidad de supervivencia del embrión es de 30%, con 2 ng/ml es del 50%, con 3 ng/ml es del 60%, con 4 ng/ml es del 65% y con 5 ng/ml es del 70% (Gráfica 5).



Gráfica 5. Probabilidad de supervivencia del embrión de acuerdo a los niveles de P₄ (Diskin et al., 2006).

Una posible causa de que se hayan obtenido bajos resultados en este trabajo, en lo referente a porcentajes de gestación puede ser lo reportado por Cutaia et al. (2010), quienes mencionan que los altos niveles de P₄ durante el tratamiento suprimen la frecuencia y magnitud de los pulsos de LH, lo cual afecta el crecimiento del folículo dominante y la ovulación. Esto cobra mayor relevancia en vaquillas cebú o cruce con cebú, en las cuales se ha demostrado que tienen menor capacidad para metabolizar la P₄ liberada por los dispositivos (Baruselli et al., 2005, citado por Cutaia). En el 2006, McNeil et al. (citado por Diskin et al., 2006) encontraron que la expresión de mRNA para el receptor de progesterona, es sensible a los cambios en las concentraciones periféricas de progesterona durante la primer semana posterior a la IA.

Estrés calórico.

Durante la realización del experimento prevalecieron temperaturas ambientales mayores a las esperadas debido a que fueron superiores a los 40°C, esto pudo influir en los porcentajes de gestación obtenidos.

Es bien sabido que factores ambientales tales como la duración del día, lluvias, fuertes vientos y altas temperaturas influyen sobre la eficiencia reproductiva en los bovinos (Grajales et al., 2010; Santolaria et al., 2010; O'Brien et al., 2010).

Con respecto a los incrementos de temperatura se ha observado que en vacas con estrés calórico de 37°C y con humedad del 38% hubo reducción en el peso y talla del producto durante la preñez temprana, además se observaron menores tasas de preñez. Los efectos del estrés calórico durante la gestación temprana pueden generar resultados dramáticos en el reconocimiento materno de la gestación e implantación (Biggers et al., 1987; Diskin y Morris, 2008; Ryan et al., 1993; O'Brien et al., 2010).

Otro aspecto importante, es que durante la temporada de calor hay un aumento marcado en la incidencia de muertes embrionarias entre los días 7 y 14 de gestación (Berg et al., 2010). Con respecto a esto Hernández et al. (2004) sugieren que los embriones (Holstein y Angus) que no sufran estrés calórico en el día 4 posterior a la inseminación tienen desarrollo similar a los embriones no expuestos a este estrés. Esto podría indicar que si se presentaron temperaturas elevadas entre los días 1 y 4 después de la inseminación esto afectó los porcentajes de gestación obtenidos. También han reportado que a 41°C se reduce el desarrollo del embrión en las razas no adaptadas al calor. Este aspecto tiene mucha relevancia ya que si durante estos días los animales no sufren de estrés calórico, las probabilidades de supervivencia con respecto a este punto pueden ser mayores (Hernández et al., 2004). En este trabajo las temperaturas durante el mes en que se inseminaron las vaquillas se estimaron en ≥ 40 °C durante el día. A pesar de que no se cuenta con datos exactos de las temperaturas diarias, los promedios mensuales son indicativos de que se presentó un estrés calórico importante durante el transcurso de las inseminaciones.

Entre los aspectos moleculares relacionados con la resistencia al estrés calórico se encuentra las proteínas de choque de calor (Hsp) La expresión de estas proteínas se ha detectado tanto en gametos como en embriones en etapa temprana. Esto sugiere que la expresión del gen de Hsp está relacionada con la supervivencia del embrión y con la gestación exitosa. Aunque el Hsp70 se induce por estrés, se encontró este gen en vacas de diferentes edades y que no sufrieron estrés, lo que puede indicar una característica directamente relacionada con la genética del animal (Rosenkrans et al., 2010).

Por otra parte las Hsps pueden aumentar o disminuir la expresión de las isoformas de los receptores de progesterona, lo cual va a aumentar o disminuir el efecto de progesterona, este aspecto puede influir evidentemente en los niveles de

progesterona, que como ya se mencionó influyen en el éxito de la gestación (Rekawiecki et al., 2008).

Aunado a todo lo anterior se ha observado un incremento en la secreción de $\text{PgF}_{2\alpha}$ en animales afectados por estrés calórico, infecciones uterinas y mastitis, lo cual puede causar muerte temprana del embrión (Inskeep, 2004).

Balance energético negativo.

El experimento se realizó en el periodo primavera-verano, ya que durante esta época es cuando los ganaderos de la región realizan los programas de reproducción, ya que, de acuerdo a su experiencia, es cuando se obtienen mejores resultados. En este periodo no hay suficiente forraje y el que está disponible no es de la mejor calidad. Este aspecto afecta el metabolismo de los animales generando un balance energético negativo (Negative Energy Balance NEB).

En cuanto a este aspecto se ha observado que la restricción de energía en la dieta afecta adversamente la función ovárica en vaquillas reduciendo el diámetro máximo y la persistencia de los folículos dominantes (Bó et al., 2003; Watterman y Buttler, 2010).

Además, está bien documentado que el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) aumenta el número de sitios de unión a LH y potencializa la producción de LH. El balance energético negativo (NEB) causa una disminución en las concentraciones circulantes de proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs). Esto puede afectar la luteinización del cuerpo lúteo, lo cual podría generar un CL disfuncional, el cual tal vez no produzca suficiente progesterona para mantener la gestación y pueda desencadenar la reabsorción embrionaria (Diskin et al., 2006; Watterman y Buttler, 2010; Hersom, 2008).

En 1994 Britt (citado por Diskin et al., 2006) propuso que los folículos expuestos a condiciones adversas como el NEB durante el inicio de su crecimiento tendrían menor desarrollo resultando en la producción de ovocitos de menor calidad y cuerpo lúteo disfuncional.

VIII. CONCLUSIONES.

La retención de DIVs fue excelente y esto confirma que la utilización de estos dispositivos en este tipo de ganado y bajo las condiciones de manejo del mismo conduce a la obtención de buenos resultados.

Con respecto a la eficiencia del programa de sincronización utilizado en el presente estudio, los resultados de este trabajo indican que fue excelente en cuanto a la presentación de calores.

En relación a los resultados obtenidos con la IA a primer servicio con los dos grupos de semen utilizado, bajo las condiciones ambientales de trópico y las características genéticas de las vaquillas utilizadas, en las hembras inseminadas con semen adicionado con las HBPs (FAA y TIMP-2) aumentó la fertilidad con respecto al grupo testigo, por lo que puede concluirse que la adición de las proteínas ligadoras de heparina utilizadas en este estudio mejoró la fertilidad, aumentando el porcentaje de gestación en vaquillas. De esta forma, el adicionar estas proteínas al semen bovino congelado puede ser una herramienta útil para mejorar los resultados de los programas reproductivos que se llevan a cabo en bovinos de trópico.

En lo correspondiente al porcentaje de gestación en base a la CC, algunas vaquillas con baja condición quedaron gestantes con el semen con HBPs, mientras que ninguna se logró gestar con el semen testigo. Por lo anterior, es posible concluir que la adición de HBPs al semen puede aumentar la fertilidad en el ganado bovino cuando se encuentra en condiciones que no les son favorables para la reproducción.

Sin embargo a pesar de lo realizado en este trabajo en un intento por mejorar los porcentajes de gestación, debe tomarse en cuenta que existen una serie de

factores que no pueden ser controlados y que actúan disminuyendo la eficiencia de los programas reproductivos, como son el medio ambiente, la nutrición, la genética, y la interacción entre estos.

Hasta el momento, este es el primer trabajo en el que se reporta la utilización del FAA y el TIMP-2 en un programa de sincronización e IA en bovinos de trópico.

IX. PERSPECTIVAS DE ESTUDIO.

1. Investigar más acerca de las funciones específicas de este complejo de proteínas sobre la fisiología espermática y sobre la histofisiología del tracto genital de la vaca. Esto al realizar más programas de IA, inseminando más vacas y vaquillas de diferentes razas y en diferentes condiciones climáticas, que permitan evaluar los resultados cuando los animales no están expuestos al estrés calórico.
2. Investigar más acerca de la dosis de las HBPs a utilizar en una pajilla de semen congelado.
3. Trabajar en animales en mejores condiciones ambientales y por lo tanto con mejor condición corporal.
4. Evaluar el efecto de adicionar las HBPs al semen en programas de inseminación artificial en ganado lechero, en distintos sistemas de manejo.
5. Todo lo anterior deberá tener la finalidad de obtener porcentajes de gestación superiores al promedio de cada raza, grupo de edad y condición climática cuando se lleven a cabo programas de IATF.

X. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abou-haila, A., DRP, Tulsiani. (2009). Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 485: 72-81.
2. Alghamdi, AS., DN, Foster. (2005). Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biology of Reproduction* 73: 1174-1181.
3. Alghamdi AS., DN, Foster., MH, Troedsson. (2004). Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction* 127: 593-600.
4. Anderson, LH., Bullock, KD. (2000). Pelvic measurements and calving difficulty. Cooperative Extension Service. University of Kentucky. USA.
5. Arangasamy, A., LP, Singh., N, Ahmed., MR, Ansari., GC, Ram. (2005). Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 90: 243-254.
6. Arenas, ER., AR, Cambrón., DG, Ambríz., RPJP, Zúñiga., AT, Rodríguez., AG, Rosado. (2010). Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *Contactos* 78: 5-11.
7. Assumpção, TI., W, Fontes., MV, Souza., CAO, Ricart. (2005). Proteome Analysis of Nelore Bull (*Bos taurus indicus*) Seminal Plasma. *Protein & Peptide Letters* 12: 813-817.
8. Ax, RL., HE, Hawkins., SK, DeNise., TR, Holm., HM, Zhang., JN, Oyarzo., ME, Bellin. (2002). New developments in managing the bull.

Factors Affecting calf crop: biotechnology of reproduction. Fields, MJ, RS, Sand, JV, Yelich. Ed CRC Press LLC, Florida, USA. Pags 287-295.

9. Ax, RL., K, Dickson., RW, Lenz. (1985). Induction of acrosome reactions by chondroitin sulfates *in vitro* corresponds to nonreturn rates of dairy bulls. Journal of Dairy Science. 68: 387-390.
10. Ax, RL., RW, Lenz. (1987). Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. Journal of Dairy Science. 70: 1477-1486.
11. Barrios, B., R, Pérez-Pérez., M, Gallego., A, Tato., J Osada., T, Muiño-Blanco., JA, Cebrián- Pérez. (2000). Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. Biology of Reproduction 63: 1531-1537.
12. Bellin, ME., HE, Hawkins., JN, Oyarzo., RJ, Vanderboom., RL, Ax. (1996). Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. Journal of Animal Science. 74: 173-182.
13. Bellin, ME., HE, Hawkins., RL, Ax. (1994). Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. Journal of Animal Science. 72: 2441-2448.
14. Bellin, ME., JN, Oyarzo., HE, Hawkins., H, Zhang., RG, Smith., DW, Forrest., LR, Sprott., RL, Ax. (1998). Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. Journal of Animal Science 76: 2032-2039.
15. Berg, DK., J, Van Leeuwen., S, Beaumont., M, Berg., PL, Pfeiffer. (2010). Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. Theriogenology 73: 250-260.

16. Biggers, BG., RD, Geisert., RP, Wetteman., DS, Buchanan. (1987) Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *Journal of Animal Science*. 64: 1512-1518.
17. Bó, GA. (2002) Dinámica folicular y tratamientos hormonales para sincronizar la ovulación en el ganado bovino. XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Venezuela pags. 1-17.
18. Bó, GA., MG, Colazo., MF, Martínez., JP, Kastelic., RJ, Mapletoft. (2006). Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestágenos y diferentes esteres de estradiol. *Biotecnologia da Reprodução em Bovinos (2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada) Brasil*. pags. 71-84.
19. Bó, GA., PS, Baruselli., MF, Martínez. (2003). Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science* 78: 307-326.
20. Breitbart, H. (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187: 139-144.
21. Brinkmann V., U, Reichard., C, Goosmann., B, Fauler., Y, Uhlemann., DS, Weiss., Y, Weinrauch., A, Zychlinsky. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
22. Cutaia, LE., LC, Peres., D, Pincinato., PM, Chesta., M, Ramos., G, Bo. (2010). Programas de sincronización de celos en vaquillonas de carne: Puntos críticos a tener en cuenta. Primer Curso de reproducción bovina Syntex. Villahermosa, Tabasco, México.

23. Chandonnet, L., KD, Roberts., A, Chapdelaine., P, Manjunath. (1990). Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development* 26: 313-318.
24. Dapino, DG., JM, Teijeiro., MO, Cabada., PE, Marini. (2009). Dynamics of heparin-binding proteins on boar sperm. *Animal Reproduction Science* 116: 308-317.
25. Dawson, GR. (2005). Localization on sperm, quantification and molecular features of two seminal proteins. PhD Dissertation, Arizona University, USA. 37-48.
26. Diskin, MG., JJ, Murphy., JM, Sreenan. (2006). Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reproduction Science* 96: 297-311.
27. Diskin, MG., DG, Morris. (2008). Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*. 43 (Suppl 2): 260-267.
28. Enciclopedia de los Municipios de México (2010). INAFED-SEGOB.
29. Fernandes, CE., FF, de Souza., JA, Souza-Neto., PEM, Ribola. (2008). Heparin-binding proteins of seminal plasma in Nellore bulls. *Ciencia Rural, Santa Maria, Online*.
30. Ferreira, F., MIM, Mello., CES, Fernandes., PE, Martins., MD, Lopes. (2006). Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. *Theriogenology* 66: 1606-1609.
31. Fricke, PM. (2002). Scanning the future ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *Journal of Dairy Science*: 85: 1918-1926.

32. Gadella, BM. (2008). Sperm membrane Physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science* 107: 229-236.
33. Galina, CS., A, Orihuela. (2007). The detection of estrus in cattle raised under tropical conditions: what we know and what we need to know. *Hormones and Behavior* 52: 32-38.
34. Gene, HD. (1992). Pelvic measurements for reducing calving difficulty. *Beef cattle handbook*. University of Nebraska. USA.
35. Gigli, I., A, Russo., A, Agüero. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*. 8(1): 183-204.
36. Grajales, LH., VA, Hernández., E, Prieto. (2010). Niveles de progesterona durante el ciclo normal y silencioso en bovinos en el trópico colombiano. *Revista MVZ Córdoba* 15(2): 2060-2069.
37. Hanzen, CH., M, Pieterse., O, Scenzi., M, Drost. (2000). Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation *per rectum*. *The Veterinary Journal* 159: 161-70.
38. Harper, MJK. (1994). Gamete and zygote transport. *Physiology of reproduction*. Knobil E, JD Neil. Ed. Raven Press, New York. USA. Pags 123-187.
39. Harshan, HM., LP, Singh., A, Arangasamy., MR, Ansari., S, Kumar. (2006). Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 93: 124-133.

40. Herd, DB., LR, Sprott. (1986). Body condition, nutrition and reproduction of beef cows. Extension Bulletin. No 1526, Texas A&M University, College Station, Texas, USA.
41. Hersom, JM. (2008). Opportunities to enhance performance and efficiency through nutrient synchrony in forage-fed ruminants. *Journal of Animal Science* 86(E. Suppl): 306-317.
42. Hernández, CJ., CC, Chase Jr., PJ, Hansen. (2004). Differences in heat tolerance between preimplantation Embryos from Brahman, Romosinuano and Angus breeds. *Journal of Dairy Science* 87: 53-58.
43. Imam, S., MR, Ansari., N, Ahmed., A, Kumaresan. (2008). Effect of oviductal fluid proteins on buffalo sperm characteristics during cryopreservation. *Theriogenology* 69: 925-931.
44. Ignatz, GG., MY, Cho., SS, Suarez. (2007). Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biology of Reproduction* 77: 906-913.
45. Inskip, EK. (2004). Preovulatory, postovulatory and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science*. 82(E Suppl): 24-39.
46. Killian, GJ., DA, Chapman., LA, Rogowski. (1993). Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction* 49: 1202-1207.
47. Kjelland, ME., TC McCauley., RW, Lenz., KM, Evans., RL, Ax., J, Moreno. (2010). Nuevas biotecnologías que contribuyen a evaluar y mejorar la capacidad fertilizante del semen. *Curso Internacional: Tecnologías Innovativas en Mejoramiento Genético para una Ganadería*

Sustentable. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas e Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva INDES-CES. Chachapoyas, Perú.

48. Kraus, M., M, Tichá., V, Jonáková. (2001). Heparin-binding proteins of human seminal plasma homologous with boar spermadhesins. *Journal of Reproductive Immunology* 51: 131-144.
49. Kumar, V., I, Hassan., T, Kashav., TP, Singh., S, Yadav. (2008). Heparin-binding proteins of human seminal plasma: purification and characterization. *Molecular Reproduction and Development* 75: 1767-1774.
50. La Falci, VSN., H, Tortorella., JL, Rodrigues., A, Brandelli. (2001). Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology* 57: 1035-1048.
51. Lamb, GC. (2002). Reproductive real-time ultrasound technology: an application for improving calf crop in cattle operations. *Factors Affecting calf crop: biotechnology of reproduction*. Fields, MJ., RS, Sand., JV, Yelich. Ed CRC Press LLC, Florida, USA. Pags 231-246.
52. Leal, ACMS., MC, Caldas-Bussiere., CS, Paes de Carvalho., KS, Viana., CR, Quirino. (2009). Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced *in vitro* capacitation. *Animal Reproduction Science* 116: 38-49.
53. Lenz, RW., H, Zhang., JN, Oyarzo., ME, Bellin., RL, Ax. (2000). Bovine fertility-associated antigen (FAA) and a recombinant segment of FAA improve sperm function. Society for the Study of Reproduction, Abstract # 80.

54. Lusignan, MF., A, Bergeron., MH, Crête., C, Lazure., P, Manjunath. (2007). Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1 -A2 proteins, members of the BSP protein family. *Biology of Reproduction* 74: 424-432.
55. MacNeil, MD., TW, Geary., GA, Perry., AJ, Roberts., LJ, Alexander. (2006). Genetic partitioning of variation in ovulatory follicle size and probability of pregnancy in beef cattle. *Journal of Animal Science* 84: 1646-1650.
56. Macmillan, KL., BVE, Segwagwe., CS, Pino. (2003). Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. *Animal Reproduction Science* 78: 327-344.
57. Manjunath, P., A, Bergeron., J, Lefebvre., J, Fan. (2007). Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Spermatology* 65: 217-229.
58. Martínez, MF., JP, Kastelic., GP, Adams., E, Janzen., DH, McCartney., RJ, Mapletoft. (2000). Estrus synchronization and pregnancy rates in beef cattle given CIDR-B, prostaglandin and estradiol, or GnRH. *Canadian Veterinary Journal* 41: 786-790.
59. McCauley, TC., HM, Zhang., ME, Bellin., RL, Ax. (1999). Purification and characterization of fertility-associated antigen (FAA) in bovine seminal fluid. *Molecular Reproduction and Development* 54: 145-153.
60. McCauley, TC., HM, Zhang., ME, Bellin., RL Ax. (2001). Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Molecular Reproduction and Development* 58: 336-34.

61. McCauley, TC., ME, Bellin., RL, Ax. (1996). Localization of a heparin-binding protein to distinct regions of bovine sperm. *Journal of Animal Science* 74: 429-438.
62. McNutt, TL., GJ, Killian. (1991). Influence of bovine follicular and oviduct fluid on sperm capacitation *in vitro*. *Journal of Andrology* 12: 244-252.
63. Miller, DJ., MA, Winer., RL, Ax. (1990). Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction* 42: 899-915.
64. Mills, B. (2002). The fertility protein. *ANGUS Journal* p.46-47.
65. Moura, AA. (2005). Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. *Animal Reproduction* V 2, n 1: 3-10.
66. Nauc, V., P, Manjunath. (2000). Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP 30 kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biology of Reproduction* 63: 1058-1066.
67. Nass, SJ., DJ, Miller., MA, Winer., RL, Ax. (1990). Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. *Molecular Reproduction and Development* 25: 237-246.
68. Navarro, B., Y, Kirichok., J, Chung., DE, Clapham. (2008). Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *International Journal of Developmental Biology* 52: 607-613.
69. O'Brien, MD., RP, Rhoads., SR, Sanders., GC, Duff., LH, Baumgard. (2010). Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 38: 86-94.

70. Olivera, M., T, Ruiz., A, Tarazona., C, Giraldo. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias V 19, n 4: 426-437.
71. Patterson, DJ., Herring, WO. (1998). Pelvic measurements and calving difficulty. MU Guide. University of Missouri-Columbia, USA.
72. Perry, GA., MF, Smith., AJ, Roberts., MD, MacNeil., TW, Geary. (2006). Relationship between size of ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. Journal of Animal. Science. 85: 684-689.
73. Quintela, LA., C, Díaz., PJ, García., AI, Peña., JJ, Becerra. (2006). Ecografía y Reproducción en la Vaca. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Santiago Compostela, España pags. 29-32 y 51-65.
74. Rae, DO. (2002). Bovine estrus: tools for detection and understanding. Factors Affecting calf crop: biotechnology of reproduction. Fields, MJ., RS, Sand., JV, Yelich. Ed CRC Press LLC, Florida, USA. Pags 7-20.
75. Rekawiecki, R., MK, Kowalik., D, Slonina., J, Kotwica. (2008). Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum. Journal of Physiology and Pharmacology 59 Suppl 9: 75-89.
76. Rodríguez, JB. (2003). Métodos de uso de prostaglandina F_{2α} para sincronizar celos y ovulaciones en bovinos para carne: Una discusión crítica. Agrocienza Vol. VII No. 1 pags. 92-104.
77. Rodriguez-Martinez, H. (2007). Role of the oviduct in sperm capacitation. Theriogenology 68S: 138-146.
78. Rodriguez-Martinez, H., F, Saravia., M, Wallgren., EA, Martínez., L, Sanz., J, Roca., JM, Vazquez., JJ, Calvete. (2010). Spermadhesin PSPI/PSP II heterodimer induces migration of polymorphonuclear

neutrophils into the uterine cavity of the sow. *Journal of Reproductive Immunology* 84: 57-65.

79. Rosenkrans Jr, CH., A, Banks., S, Reiter., M, Looper. (2010). Calving traits of crossbred Brahman are associated with Heat Shock Protein 70 genetic polymorphisms. *Animal Reproduction Science* 119: 178-182.
80. Rutllant, J., M, López-Béjar., F, López-Gatius. (2005). Ultrastructural and rheological properties of bovine vaginal fluid and its relation to sperm motility and fertilization: a review. *Reproduction in Domestic Animals* 40: 79-86.
81. Ryan, DP., JF, Prichard., E, Kopel., RA, Godke. (1993). Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cold seasons of the year. *Theriogenology*: 39: 719-737.
82. Santolaria, P., F, López., I, García., G, Bech-Savat., E, Angulo., T, Carretero., JA, Sánchez-Nadal., J, Yániz. (2010). Effects of cumulative stressful and acute variation episodes of farm climate conditions on late embryo early fetal loss in high producing dairy cows. *International Journal of Biometeorology* 54: 93-98.
83. Senger, PL. (2003). Spermatozoa in the female tract – transport, capacitation and fertilization. *Pathways to pregnancy and parturition*. Current Conceptions Inc. Pullman, Washington, USA. 2^a ed. 266-283.
84. Servicio Meteorológico Nacional. (2010). Temperaturas máximas promedio. México. CONAGUA.
85. Sorensen, AM Jr. (1979). *Repro Lab: a laboratory manual for animal reproduction*. American Press, Boston, Massachusetts, USA 4^a ed. 59-65.

86. Souza, CEA., AA, Moura., E, Monaco., GJ, Killian. (2008). Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic ampullary oviductal fluid. *Animal Reproduction Science* 105: 72-89.
87. Sprott, LR., MD, Harris., DW, Forrest., J, Young., HM, Zhang., JN, Oyarzo., ME, Bellin., RL, Ax. (2000). Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility associated antigen. *Journal of Animal Science*. 78: 795-798.
88. Suarez, SS. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *International Journal of Developmental Biology* 52: 455-462.
89. Thérien, I., A, Bergeron., D, Bousquet., P, Manjunath. (2005). Isolation and characterisation of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Molecular Reproduction and Development* 71: 97-106.
90. Thérien, I., R, Moreau., P, Manjunath. (1998). Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction* 59: 768-776.
91. Thirapatsukun, T., KW, Entwistle., RJW, Gartner. (1978). Plasma progesterone levels as an early pregnancy test in beef cattle. *Theriogenology* V 9, n 4: 323-329.
92. Töpfer-Petersen, E., A, Romero., PF, Varela., M, Ekhlasi-Hundrieser., Z, Dostalova., L, Sanz., JJ, Calvete. (1998). Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrología* 30: 217-224.

93. Visconti, PE., GD, Homer., GD, Moore., JL, Bailey., X, Ning., M, Fornes., GS, Kopf. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology* V 19, n 2, 242-250.
94. Waterman, RC., WR, Butler. (2010). Metabolic signals of the beef cow in negative energy balance. *Proceedings, Grazing Livestock Nutrition Conference* 93-100.
95. Whitfield, CH., TJ, Parkinson. (1992). Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology* 38: 11-20.
96. Yanagimachi, R. (1994). Mammalian Fertilization. *Physiology of Reproduction*. Knobil E., JD Neill. Ed. Raven Press, New York, USA. Pags 189-317.
97. Zhang, H., M, Bellin., R, Ax. (2001). Cloning and expression of recombinant bovine tissue inhibitor. *Plant & Animal Genome IX Conference*, San Diego, CA, USA.