UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN DE CELO PARA RECEPTORAS EN VACAS CRIOLLAS ADICIONANDO UNA FUENTE EXÓGENA DE GNRH Y LH EN EL MOMENTO DEL CELO

TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

AUTOR:

RUDBEL LEOBAR GONZÁLEZ BRICEÑO

DIRECTOR:

Dr. LENIN AGUIRRE RIOFRÍO Mg. Sc.

LOJA – ECUADOR

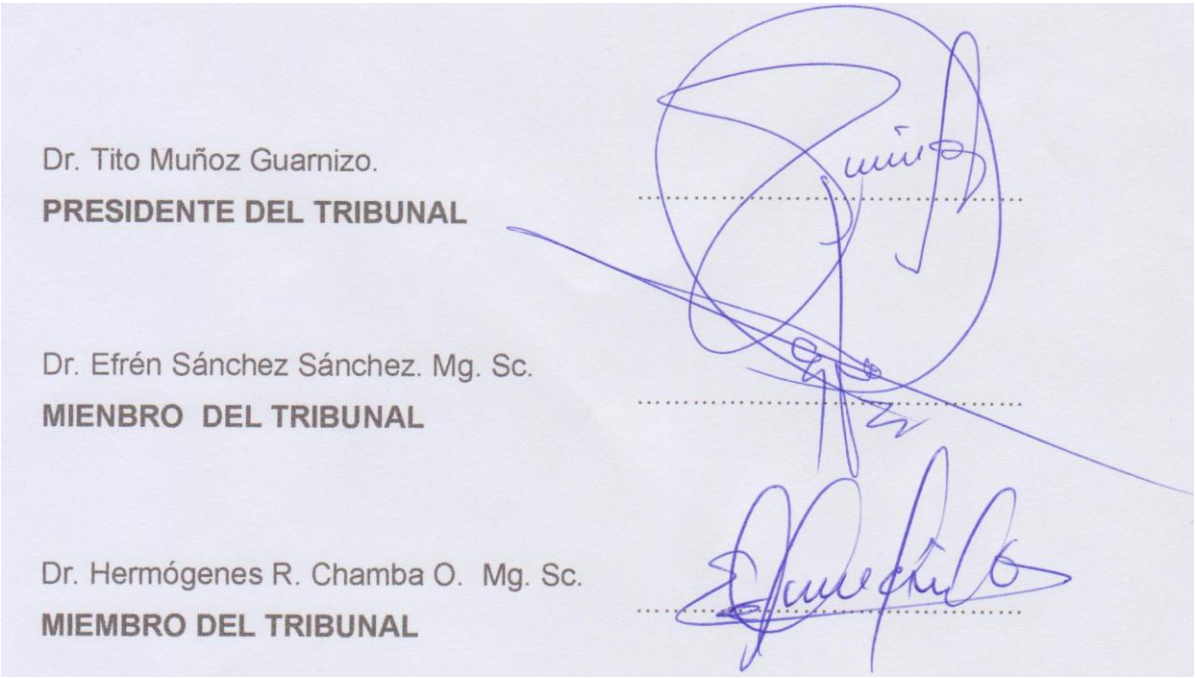
2013

"EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN DE CELO PARA RECEPTORAS EN VACAS CRIOLLAS ADICIONANDO UNA FUENTE EXÓGENA DE GNRH Y LH EN EL MOMENTO DEL CELO"

TESIS PRESENTADA AL TRIBUNAL DE GRADO COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA:



CERTIFICACIÓN

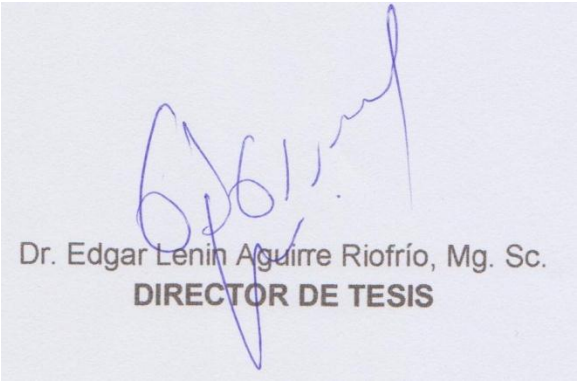
Dr.
Lenin Aguirre Riofrío. Mg. Sc.

Director de Tesis y Docente de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación denominado **"EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE SINCRINIZACIÓN DE CELO PARA RECEPTORAS EN VACAS CRIOLLAS ADICIONANDO UNA FUENTE EXÓGENA DE GNRH Y LH EN EL MOMENTO DEL CELO",** realizado por el señor egresado Rudbel Leobar González Briceño previo la obtención del título de **MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**, ha sido dirigido y revisado desde el inicio de su ejecución; por lo tanto, se autoriza su presentación final para la sustentación y defensa correspondientes.

Loja, 07 de Noviembre del 2013



AUTORÍA

Los conceptos, ideas y opiniones vertidos en el presente trabajo de investigación, así como los resultados, discusión y conclusiones son de exclusiva responsabilidad del autor.

Rudbel González

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios por haberme dado la vida en segundo lugar al cuerpo docente de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja, por darme la oportunidad de haber estudiado esta hermosa carrera, a cada uno de los que son parte de mi familia especialmente a mis padres, por haberme brindado su apoyo incondicional.

Expreso también mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que han hecho posible este gran paso en mi vida, a los compañeros y compañeras, junto a quienes compartí alegres y valiosas experiencias en mi vida académica, y en especial a los Doctores Edgar Lenin Aguirre Riofrío, Melania Uchuary y Manuel Quezada, quienes con su guía y apoyo supieron ayudarme a salir adelante en este reto.

EL AUTOR

DEDICATORIA

Dedico este proyecto investigativo a mis queridos padres; Leobar González, María Briceño, a mis hermanos y hermana, a mi esposa Margoth a mi hijo Alejandro pilares fundamentales en mi vida, sin ellos, jamás hubiese podido conseguir la meta propuesta, por creer en mí y apoyarme en todo momento.

Rudbel González

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO Pág.

PORTADA i

APROBACIÓN TRIBUNAL ii

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DE TESIS iii

AUTORÍA iv

AGRADECIMIENTO v

DEDICATORIA vi

ÍNDICE GENERAL vii

ÍNDICE DE CUADROS xi

ÍNDICE DE FIGURAS xii

RESUMEN xiii

ABSTRACT xiv

1. INTRODUCCIÓN 1

2. REVISIÓN DE LITERATURA 3

2.1. ASPECTOS ASOCIADOS A LA EFICIENCIA EN TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (T.E) RELACIONADOS CON LAS HEMBRAS RECEPTORAS 3

2.1.1. Selección de Hembras Receptoras en un Programa de TE 3

2.1.2. Importancia de la Evaluación de Estructuras Ováricas en Hembras Receptoras de Embriones 3

2.2. ELEMENTOS REFERENCIALES DEL CICLO ESTRAL, DESARROLLO EMBRIONARIO Y RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA PREÑEZ EN HEMBRAS RECEPTORAS DE EMBRIONES. 4

2.2.1. Desarrollo Folicular. 11

2.2.2. Mecanismo de Ovulación. 20

2.2.3. Formación y Consolidación del Cuerpo Lúteo. 22

2.2.4. Reconocimiento Materno Post-trasplante y Activación de Mecanismos Luteotrópicos. 24

2.2.5. Mecanismo de Implantación Embrionaria. 27

2.2.6. Activación de Mecanismos Luteolíticos. 30

2.3. FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA EN LA HEMBRA RECEPTORA EN UN PROGRAMA DE TE. 35

2.4. MECANISMOS DE CONTROL DEL CICLO ESTRAL EN UN PROGRAMA DE TE: APLICACIÓN DE TERAPIAS HORMONALES. 40

2.5. USO DE LA ULTRASONOGRAFÍA COMO HERRAMIENTA EN EL TÉCNICA DE TE. 44

3. MATERIALES Y MÉTODOS 46

3.1. MATERIALES 46

3.1.1. Materiales de Campo 46

3.1.2. Materiales de oficina 46

3.2. MÉTODOS 47

3.2.1. Ubicación del Ensayo 47

3.2.2. Selección de las Receptoras. 47

3.2.3. Unidad Experimental (UE). 48

3.2.4. Tamaño del Experimento y Manejo de las UE. 48

3.2.5. Descripción de los Tratamientos 48

3.2.6. Diseño Experimental 49

3.2.7. Variables en Estudio 49

3.2.8. Toma y Registro de Datos 49

3.2.9. Análisis Estadístico 51

4. RESULTADOS 53

4.1. TAMAÑO DE OVARIOS AL INICIO DEL TRATAMIENTO 53

4.2. TIEMPO DE PRESENTACIÓN DEL CELO MANIFIESTO POST RETIRO DIB 54

4.3. DURACIÓN E INTENSIDAD DEL CELO MANIFIESTO 56

4.4. PORCENTAJE DE ANIMALES QUE PRESENTARON CELO MANIFIESTO 58

4.5. SINTOMATOLOGÍA DEL CELO MANIFIESTO 58

4.6. TAMAÑO DEL FOLÍCULO PREOVULATORIO 60

4.7. TAMAÑO DEL CUERPO LÚTEO AL DÍA SIETE POST CELO. 61

5. DISCUSIÓN 62

5.1. TAMAÑO DE OVARIOS AL INICIO DEL TRATAMIENTO 62

5.2. TIEMPO DE PRESENTACIÓN DEL CELO MANIFIESTO POS RETIRO DIB 62

5.3. DURACIÓN E INTENSIDAD DEL CELO MANIFIESTO 63

5.4. SINTOMATOLOGÍA DE CELO MANIFIESTO 63

5.5. TAMAÑO DEL FOLÍCULO PREOVULATORIO 64

5.6. TAMAÑO DEL CUERPO LÚTEO AL DÍA SIETE POST CELO. 66

6. CONCLUSIONES 68

7. RECOMENDACIONES 69

8. BIBLIOGRAFÍA 70

9. ANEXOS 81

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO Pág.

Cuadro 1. Tratamientos aplicados en sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas 48

Cuadro 2. Promedio del tamaño de ovarios (mm) al inicio de los protocolos de sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas 53

Cuadro 3. Promedio del tiempo de presentación del celo manifiesto post retiro DIB en los protocolos de sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas (horas)..... 55

Cuadro 4. Promedio de la duración e intensidad de celo manifiesto en los tratamientos de sincronización de celo aplicados a vacas criollas (horas y porcentaje). 56

Cuadro 5. Porcentaje de animales que presentaron celo manifiesto en los protocolos de sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas..... 58

Cuadro 6. Porcentaje de sintomatología de celo manifiesto en los protocolos de sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas 59

Cuadro 7. Promedio de tamaño de folículo (mm) en los protocolos de sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas 60

Cuadro 8. Promedio del tamaño del cuerpo lúteo al día siete post celo (mm) en los protocolos de sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas..... 61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA Pág.

Figura 1. Modelo de los patrones de desarrollo folicular, luteal y perfiles de progesterona durante el ciclo estral bovino 12

Figura 2. Modelo de la dinámica folicular durante el ciclo estral bovino 14

Figura 3. Modelo en el que se relaciona los incrementos transitorios de FSH durante un ciclo estral bovino en el que se presentan tres ondas de desarrollo folicular 15

Figura 4. Promedio del tamaño de los ovarios al inicio de los diferentes tratamientos de sincronización aplicados en vacas criollas (mm). 53

Figura 5. Medición del tamaño de ovarios e inicio del tratamiento hormonal 54

Figura 6. Ecografía para determinar el tamaño de ovario 54

Figura 7. Tiempo de presentación del celo manifiesto post retiro DIB en los tratamientos de sincronización aplicados a vacas criollas 55

Figura 8. Tiempo de duración del celo manifiesto en los tratamientos de sincronización aplicados a vacas criollas 56

Figura 9. Intensidad del celo manifiesto en los tratamientos de sincronización aplicados a vacas criollas 57

Figura 10. Porcentaje de UE que presentaron sintomatología de celo manifiesto por síntoma y por tratamiento aplicados en vacas criollas 59

Figura 11. Tamaño del folículo prevulatorio en los diferentes tratamientos de sincronización aplicados en vacas criollas..... 60

Figura 12. Promedio del tamaño del cuerpo lúteo al día siete post celo en los tratamientos aplicados a vacas criollas 61

RESUMEN

Se utilizaron nueve hembras bovinas criollas de la Región Sur del Ecuador (RSE) divididas en tres protocolos de sincronización de celo para receptoras, el protocolo empleado fue: el día cero se aplicó dispositivos intravaginales (DIB®-Sintex) impregnadas con 50 mg de acetato de fluorogestona más 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE) y más 50 mg de Progesterona (P4), el día siete se aplicó 400 UI de Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG), el día ocho se retiró el DIB y más 2 ml de Prostaglandina (PGF2α), el día nueve se aplicó 1 mg de BE, la diferencia fue que en el tratamiento uno el día 10 se aplicó GNRH, en el tratamiento dos LH, y, el tratamiento tres, fue el control; para luego al día 16 observar el tamaño del cuerpo lúteo por medio de ecografía. Para cada una de las variables analizadas se realizó un ADEVA y cuando existió diferencia estadística (P> 0,05) se aplicó la prueba de Duncan; las variables a estudiar fueron: tamaño de ovarios al inicio del tratamiento donde se obtuvo un promedio en los tres tratamientos de 22,5 mm; también se midió el tiempo de presentación del celo manifiesto pos retiro DIB donde se obtuvo un tiempo promedio en los tres tratamientos de 30,1 hs; la duración e intensidad del celo en los tres tratamientos fue de 21,1 hs y la intensidad del 78 %; además todas las UE presentaron celo manifiesto con un 91,0 %, de la sintomatología presentada, también se determinó el tamaño del folículo preovulatorio por medio de ecografía obteniendo un tamaño promedio de 12,5 mm en todas estas variables no se obtuvo diferencia estadística (P> 0,05); también se evaluó el tamaño del cuerpo lúteo al día siete post celo donde sí se obtuvo diferencia estadística (P<0.05), presentando el tratamiento uno y dos resultados estadísticamente similares con un tamaño de cuerpo lúteo de 20 y 20,5 mm, respectivamente y el tratamiento tres con 17,1 mm, siendo todos estos tamaños adecuados para la recepción de un embrión, respondiendo los bovinos criollos favorablemente a los tratamientos de sincronización de celo investigados, lo que ayudara a mejorar los parámetros productivos y reproductivos en los bovinos criollos de la RSE.

ABSTRACT

Were used nine native bovine females in the Southern Region of Ecuador (CSR) divided into three protocols of synchronization of estrus to receptors, the Protocol used was: day zero were applied intravaginal devices (DIB®-Sintex) impregnated with 50 mg of fluorogestone acetate plus 2 mg of estradiol benzoate (BE) and plus 50 mg progesterone (P4), day 7 applied to 400 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG), day eight remove the DIB and more 2 ml of Prostaglandin (PGF2α), day nine was applied 1 mg of BE, the only difference was that in the treatment one in the day 10 was applied GNRH, in treatment two LH and treatment three was the control then the day 16 observe the size of the corpus luteum through ultrasound. For each of the variables analyzed was carried out an ADEVA, and when there was statistical difference (P> 0.05) was applied the Duncan test; the variables studied were: size of ovaries at the beginning of treatment where was obtained an average of 22.5 mm in the three treatments, also was measured the time for submission of manifest estrus towards removal DIB where was obtained an average time of 30.1 hs in three treatments; the duration and intensity of the estrus in the three treatments was 21.1 hs and the intensity of 78%, in addition all the UE presented evident estrus with a 91.0% of the presented symptoms; also was determined the size of pre-ovulatory follicle through an ultrasound getting an average size of 12,5 mm in all of these variables there was not statistical difference (P> 0.05); also was assessed the size of the corpus luteum to day seven postestrus where there was obtained statistical difference (P<0.05), presenting in the treatment one and two statistically similar results with a size of corpus luteum of 20 and 20.5 mm respectively and the treatment three 17.1 mm, being all these sizes suitable for the reception of an embryo, responding bovine Creoles favorably to synchronization of estrus treatments investigated, that would help to improve the productive and reproductive parameters in native cattle of CSR.

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación fue realizado en vacas criollas de la Región Sur del Ecuador; al respecto hay que considerar que en nuestra zona en su gran mayoría son ganaderos con no más de 5 UBA, los cuales desarrollan un manejo al sogueo y en condiciones muy precarias (Aguirre, L. 2005), a más de ello no se han implementado tecnologías para mejorar la reproducción y productividad de las ganaderías (si las hay, son en muy pocas ganaderías), por diversos motivos, como falta de conocimientos actualizados y aplicables al medio por parte de los profesionales del ramo y ganaderos; terrenos con topografía irregular lo que hace que se produzca una deficiente producción de forraje verde durante todo el año, considerando que los resultados positivos en la reproducción bovina se encuentran directamente asociados a las condiciones de manejo de las explotaciones, como la dotación de suficientes recursos alimenticios, condiciones adecuadas de alojamiento, mejoramiento genético (I.A., trasplante de embriones), atención a la salud, y fundamentalmente el adecuado manejo reproductivo de los hatos bovinos (uso de registros, sincronización de celos), toda vez que al existir partos existirá mayor producción de leche y terneros.

Innumerables factores intervienen en los resultados de los programas de transplante embrionario (TE) en bovinos, siendo relevantes los que tienen relación con las hembras receptoras (Tovío et al., 2008); esto se evidencia en las bajos porcentajes de eficiencia, ya que normalmente en los núcleos de receptoras tratadas con protocolos tradicionales de sincronización hormonal de ciclo estral, solamente del 40 al 50 % de las hembras clasifican para él TE, el otro 50 o 60% son descartadas por su baja o inexistente respuesta a los tratamientos de sincronización (Nasser et al., 2004).

Considerando que en nuestra RSE, la gran mayoría de bovinos son criollos y al no disponer de tecnologías reproductivas tendientes a mejorar los índices reproductivos que permitan disminuir los días abiertos y aumentar la tasa de concepción, se ha considerado a través de la presente investigación, analizar el

comportamiento de estos bovinos y bajo las condiciones de manejo imperantes en la zona, evaluar protocolos de sincronización de celos, no solo en las variables presentación de celo, sino en la variable tamaño del CL al día siete post celo, pues se considera que uno de los factores de retorno al celo post sincronización, es los bajos niveles de P4 que se traducen en el tamaño del CL en el animal, para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- ✓ Mejorar la eficiencia reproductiva en el ganado criollo mediante la aplicación de biotecnologías reproductivas con fines de conservación.

- ✓ Evaluar el comportamiento reproductivo en el ganado criollo aplicando un protocolo de sincronización de celo a tiempo fijo.

- ✓ Considerar el tamaño del cuerpo lúteo aplicando fuentes exógenas de GNRH y LH.

- ✓ Difundir los resultados obtenidos, tanto al medio interno a la Universidad, como al medio externo donde se realizó la investigación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ASPECTOS ASOCIADOS A LA EFICIENCIA EN TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (T.E) RELACIONADOS CON LAS HEMBRAS RECEPTORAS

2.1.1. Selección de Hembras Receptoras en un Programa de TE

En el éxito de un programa de transferencia de embriones influyen muchos factores, uno de los más importantes es la selección de las novillas receptoras (Gonzáles, 2001; Chagas, 2002 y Sartori, 2004); éstas deben ser saludables y reproductivamente sanas (Huertas, 1991), verificando la presencia de estructuras que demuestren ciclicidad ovárica. El objeto de la exploración y valoración clínico-reproductiva es rechazar animales con anormalidades reproductivas (órganos sexuales juveniles, hermafroditismo, ninfomanía, infecciones uterinas, entre otros) descartando también novillas que presenten sobrepeso (Gordon, 1999).

Las hembras que están ciclando no deben ser expuestas a los toros y se debe contar con un sistema de identificación de los animales que sea simple, efectivo y permanente, que permita llevar a cabo una de detección eficiente de calores (Gordon, 1999).

Además de los factores individuales que afectan la efectividad en las novillas utilizadas en un programa de TE, la nutrición y los niveles energéticos en la dieta tanto de la donadora como de la receptora son puntos importantes para tener en cuenta (López, 2005).

2.1.2. Importancia de la Evaluación de Estructuras Ováricas en Hembras Receptoras de Embriones

En la evaluación de las estructuras ováricas en las hembras receptoras de embriones, por medio de ultrasonografía trans-rectal, se ha podido determinar que la estructura del folículo preovulatorio afecta de manera directa el subsecuente tamaño del cuerpo lúteo, observando que un folículo preovulatorio de 1.3 cm da paso a un cuerpo lúteo que el día siete mide 5 milímetros de diámetro y produce

niveles de progesterona plasmáticos de 1.22 ng/ml y el día 14 el mismo cuerpo lúteo mide 6 milímetros de diámetro y genera concentraciones plasmáticas de progesterona de 2.48 ng/ml. Así mismo un folículo preovulatorio de mayor tamaño (1.6 cms) ha dado paso a un cuerpo lúteo que el día siete mide 6 milímetros de diámetro y produce unos niveles de progesterona plasmáticos de 1.61 ng/ml y el día 14 el cuerpo lúteo mide 9 milímetros de diámetro y genera unas concentraciones sanguíneas de 3.05 ng/ml ($P < 0.05$). Al haber una mayor producción de progesterona plasmática se esperaría generar unas condiciones uterinas más favorables para el desarrollo embrionario temprano (Kastelic, 1990; Bridges, 2000; Vasconcelos, 2001 y Sartori, 2002). Por eso es importante determinar el tamaño de las estructuras ováricas antes de realizar la transferencia del embrión a la hembra receptora, lo cual permite la obtención de mejores resultados después de la aplicación de la técnica de TE (Duica, 2007).

2.2. ELEMENTOS REFERENCIALES DEL CICLO ESTRAL, DESARROLLO EMBRIONARIO Y RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA PREÑEZ EN HEMBRAS RECEPTORAS DE EMBRIONES

Para comprender lo que ocurre dentro del ciclo estral sincronizado por medio de la utilización de terapias hormonales, es necesario comprender las diferentes etapas y fases involucradas dentro de un ciclo estral en condiciones no controladas. Por ese motivo se hace un acercamiento a los diferentes aspectos que enmarcan el ciclo.

El desarrollo reproductivo en el animal inicia en la fase fetal en la que se produce la formación de los órganos reproductivos; pero éstos van a iniciar su actividad completa hasta que el organismo presente un estado de desarrollo corporal (madurez) que permita iniciar la pubertad. Durante el periodo pre y puberal comienzan a desencadenarse una serie de cambios iniciados por acción hormonal, que tienen como finalidad producir la primera ovulación efectiva, evidenciando así externamente el comportamiento sexual de la hembra bovina, con el incremento de la concentración sanguínea de hormonas gonadotrópicas y

su factor liberador (Hernández, 2001). Esta etapa del desarrollo reproductivo del animal depende de una serie de factores que lo afectan, como son la raza, el estado nutricional, temperatura ambiental, la humedad relativa, el fotoperiodo, el peso del animal, entre otros (Baruselli, et al 2005). Durante el periodo prepuberal el animal experimenta un bloqueo en la liberación de gonadotropinas hipofisiarias, en donde los pulsos de estas hormonas son de baja amplitud y baja frecuencia. La inhibición es producida, principalmente, por la acción de los estrógenos, que generan un bloqueo en el eje hipotálamo-hipofisiario; a medida que el animal se acerca a la etapa puberal, esta sensibilidad hacia los estrógenos va disminuyendo progresivamente ya que el número de receptores para estradiol en el hipotálamo disminuye durante la pubertad. A continuación, se inicia la liberación de las gonadotropinas hipofisiarias, permitiendo que se aumenten tanto la frecuencia como la amplitud en los incrementos transitorios de liberación de estas hormonas (Hernández, 2008). Los estrógenos también actúan estimulando la liberación de sustancias de características opioideas como las endorfinas-β las cuales suprimen la liberación del factor liberador de gonadotropinas, incrementando el bloqueo hormonal durante la etapa prepuberál (Hernández, 2001).

El control reproductivo neuroendocrino en la hembra bovina se produce por la suma de varios factores que intervienen en el comportamiento y el desencadenamiento de las etapas del ciclo estral. El ciclo estral es el conjunto de sucesos ocurridos en la hembra bovina entre dos estros, el cual tiene una duración 18 a 21 días (Hafez, 2000; Senger, 2003 y Hernández, 2008).

Inicialmente el entorno juega un papel importante ya que va a tener un impacto directo sobre la actividad estral de la hembra bovina (Bridges, 2000 y Maldonado, 2005). Normalmente la hembra bovina presenta ciclos estráles en forma continua durante todo el año, razón por la que se clasifica como poliéstrica continua (Hafez, 2000).

Otro factor que incide de manera directa sobre el comportamiento reproductivo en el animal, está asociado con la nutrición, ya que al brindarle una alimentación balanceada a éste, va a expresar de manera efectiva su potencial genético; sin

desconocer la importancia adicional de mantener un excelente status sanitario y un excelente manejo. La unión de éstos factores va a permitir que el animal presente un comportamiento reproductivo regular (Gorlach, 1999).

El ciclo estral de la hembra bovina está dividido en dos fases, la folicular y la luteal; en cada una de las fases se encuentran presentes en el ovario estructuras características como el folículo y el cuerpo lúteo respectivamente. A su vez el ciclo presenta cuatro estados, en los que el útero y los ovarios presentan una serie de cambios característicos, estos son el proestro, el estro, el metaestro y el diestro (Senger, 2003). Todos los cambios presentes en las estructuras ováricas y uterinas, son controlados por mecanismos neuroendocrinos, que se desencadenan en el encéfalo ya que el cerebro recibe señales nerviosas del ambiente que rodea al animal; estos estímulos son enviados por los órganos sensitivos que transforman la información obtenida en impulsos nerviosos, los cuales son dirigidos a varias zonas del cerebro, en donde son codificados y retransmitidos al hipotálamo, que integra el sistema neuro-endocrino. El hipotálamo es una estructura altamente especializada, ubicada entre el quiasma óptico y los cuerpos mamilares; a la que se dirigen estímulos del cerebro y envía señales de tipo hormonal y nervioso a una glándula bilobulada denominada hipófisis. La comunicación entre estas dos estructuras se lleva a cabo por medio del eje hipotálamo hipofisiario, por medio de hormonas encargadas de controlar un gran número de actividades fisiológicas en el organismo (Rivera, 1992), las cuales intervienen en cada una de las diferentes etapas del ciclo estral.

Dentro de las etapas del ciclo se encuentra el proestro, el cual es influenciado por la acción de los estrógenos procedentes de los folículos en desarrollo, este incremento en los niveles desencadenan el aumento en la turgencia de las paredes del útero, mientras que en la vagina se produce un mayor aporte sanguíneo produciendo en las mucosas una coloración rosa; así mismo comienza a evidenciarse la presencia de moco cervical (Hafez, 2000); esta etapa tiene una duración cercana a tres días; al iniciar este estado se encuentra el animal en el final de la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior, el cual está bajo influencia

de la PGF2α de origen uterino, que es un importante y potente agente luteolítico (Niswender, 1994); también intervienen en este proceso otras hormonas como los estrógenos, la oxitocina, la LH y la misma progesterona, además de péptidos como la endotelina 1, proteínas como el factor de necrosis tumoral y células del sistema inmune, entre otros; de esta forma, el cuerpo lúteo sufre una la regresión funcional en la que experimenta una rápida disminución de peso y tamaño de las células que lo forman (Zeng, 1994). La liberación de progesterona desciende al inicio del estado de proestro, debido a la regresión estructural determinada por la degradación de las células que conforman el cuerpo lúteo, (luteolisis) (Pate, 1994), desencadenada por el aumento de la concentración del Calcio intracelular, que estimula las enzimas endonucleasas fragmentadoras del DNA (Niswender, 1994).

La regresión del cuerpo lúteo finalmente va a generar una estructura cicatrizal no funcional llamada cuerpo albicans. Con la disminución de los niveles de progesterona se desactiva el efecto de retroalimentación negativa ejercido en el encéfalo, permitiendo el aumento en la producción y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo; esto hace que se liberen las gonadotropinas de síntesis hipofisiaria, produciendo un aumento en la frecuencia de la liberación pulsátil de LH y de FSH (Ineskeep, 2004).

Al aumentar la producción de GnRH la adhenohipófisis se sensibiliza cada vez más aumentando la respuesta ante la acción de la hormona liberadora, lo que va a permitir que se liberen más hormonas hipofisiarias durante la fase folicular, favoreciendo el desarrollo de las ondas de desarrollo folicular en el ovario. A medida que se produce el desarrollo del folículo, este aumenta la producción de estradiol, el cual va actuar en el encéfalo, generando una mayor producción de hormonas hipofisiarias, especialmente LH, pero también actúa sobre el tracto reproductivo, preparando a la hembra para el periodo del estro (Palma, 2001).

El estro es un estado en el cual hay una fuerte influencia estrogénica; presenta una duración entre 4 y 24 horas (Senger, 2003). Durante esta etapa el estradiol circulante produce cambios en el tracto reproductivo, encontrándose una marcada

turgencia a nivel uterino. La mucosa vaginal se va a encontrar altamente irrigada, motivo por el cual se encuentra edematizada, congestionada y de color rojizo.

Dentro de los cambios presentes en el útero, en el cérvix se evidencia una marcada dilatación de esta estructura, y su zona externa se encuentra expuesta hacia la mucosa vaginal; esta serie de cambios son regulados por la acción de la oxitocina (Fuchs, 1996), la progesterona y la prostaglandina E2 durante el proestro y el estro (Shemesh, 1997).

La producción de moco cervical es también influenciada por acción estrogénica, haciendo que se aumente la producción, desencadenando la descarga hacia el exterior del sistema reproductivo. El moco se torna menos viscoso, hialino, cristalino y se producen cambios en su conformación ya que el sistema de arborización del moco al encontrarse bajo la influencia estrogénica, permite que las moléculas de glucoproteina que lo conforman, abran espacios entre las fibras permitiendo el paso de los espermatozoides, para el momento en que es depositado el material seminal por parte del macho (Hafez, 2000).

El estro está acompañado por una serie de conductas en la hembra como la disposición de ésta a recibir el macho, permitir que otras hembras la monten, está inquieta, levanta la cola, brama con frecuencia, disminuye su apetito, está ansiosa.

En ese momento es inducido un mecanismo de retroalimentación positiva que estimula al hipotálamo para que se produzca la liberación de GnRH, desencadenando la liberación de FSH y LH aumentando la amplitud y frecuencia de los pulsos de estas hormonas (Palma, 2001). La liberación de la hormona luteinizante, continua incrementándose, hasta que se produce un aumento transitorio (pico) en su liberación, antes del evento de la ovulación, que ocurre entre el estro y el metaestro, denominado como pico preovulatorio (Bó, 2002)

El siguiente periodo del ciclo estral una vez terminado el periodo de estro es el metaestro, que tiene una duración aproximadamente de seis días, durante el cual los niveles estrogénicos caen de una manera abrupta, mientras que los niveles

progestágenos comienzan a incrementarse; al inicio de este periodo se lleva a cabo un importante evento en el ciclo estral de la hembra bovina, en el que el folículo se rompe liberando el líquido folicular y un oocito, el cual ha estado adosado a la superficie interna del folículo por el *cumulus oophorus*; Al producirse la ovulación, que ocurre 10 a 20 horas después de terminado el estro en el caso de la hembra bovina, un oocito es liberado para su próxima fecundación (Rodríguez, 2001).

A lo largo del ciclo estral la liberación de hormonas presenta un comportamiento a manera de elevaciones transitorias o picos, los cuales varían en amplitud y frecuencia; al inicio del metaestro se produce un incremento en la liberación de hormona luteinizante (LH), llamado pico preovulatorio, mediante el cual va a desencadenarse un incremento en la irrigación sanguínea que se dirige al ovario generando un proceso inflamatorio en el folículo preovulatorio que es favorecido por la acción de agentes vasoactivos (Espey, 1994); desencadenando un proceso de edematización en las células que conforman los estratos celulares de la teca interna y externa folicular; aumentándose la presión intrafolicular y favoreciendo el mecanismo de ovulación.

La liberación de LH preovulatoria también genera una señal que actúa sobre la membrana plasmática de varios tipos de células presentes en el folículo maduro, produciendo su despolarización; lo cual altera la concentración de líquidos intra y extracelulares, propiciando la disminución del espesor de la pared del folículo (Espey, 1994). Este paso de líquidos al interior del folículo favorece la degradación del tejido conectivo presente en la pared externa folicular, induciendo la formación de un área de adelgazamiento de esta pared que recibe el nombre de estigma folicular y se convierte en el sitio exacto para el rompimiento del folículo produciendo la ovulación. Este proceso también es mediado por la acción de la hormona prostaglandina F2α, ya que ingresa a las células foliculares y produce el rompimiento de los lisosomas de estas células, liberando enzimas que favorecen a la formación del área de ovulación en la pared folicular externa, la PGF2α genera la contracción de toda la estructura folicular desencadenando la liberación del

folículo por el incremento de la presión intrafolicular, el cual queda libre en el espacio periovárico en donde es captado por las fimbrias, las que por acción hormonal en el momento de la ovulación están dispuestas hacia el ovario captando el oocito y lo direccionan hacia el interior del oviducto (Senger, 2003).

A lo largo del metaestro, se incrementan los niveles de progesterona circulante; después de la ovulación y mediante la ayuda de esta hormona se genera una disminución de la acción inflamatoria que se presentaba en el folículo preovulatorio (Espey, 1994). Al liberarse el oocito y el líquido folicular que ejercían una gran presión dentro de esta estructura; el gran espacio presente en la superficie ovárica es llenado rápidamente de sangre, recibiendo el nombre de cuerpo hemorrágico; en este momento (en este punto) comienza a formarse una intrincada red de capilares que invaden esta zona. A continuación, las células de la teca inician un proceso de hipertrofia, hiperplasia y migración hacia las células de la granulosa; este conjunto de células aumentan el número de receptores de membrana para hormonas hipofisiarias, pero en mayor número para receptores de LH. Las células que estaban presentes en el folículo comienzan a transformarse morfológica, endocrina y bioquímicamente, para convertirse en células luteales desarrollando así, siete días después de presentado el celo, un cuerpo lúteo totalmente funcional (Kastelic, 1990; Niswendender, 1994; Smith, 1994 y Chabbert- Buffet, 2000).

Estructuralmente el cuerpo lúteo presenta dos tipos de células, las células luteales grandes, que provienen de las células de la granulosa del folículo y las células luteales pequeñas, derivadas de las células de la teca interna (Rivera, 1992; Smith, 1994 y Palma, 2001).

Una vez formado un cuerpo lúteo totalmente desarrollado, consolidado y funcional el animal alcanza el estado de diestro que tiene una duración entre 10 y 14 días.

El diestro se encuentra bajo la influencia del cuerpo lúteo y la hormona que presenta una mayor actividad en esta etapa es la progesterona. La anterior hormona actúa sobre el útero favoreciendo el desarrollo embrionario temprano ya

que permite un ambiente uterino adecuado (Grygar, 1997; Bridges, 2000 y Chabbert-Buffet, 2000). El útero presenta una disminución de la tonicidad miometrial, característica de esta etapa, que favorece la fijación del *conceptus* para así prevenir pérdidas embrionarias tempranas (Ineskeep, 2004; Green, 2005). La mucosa vaginal se encuentra pálida y seca, mientras que el cervix está contraído y sellado por un moco cervical que es escaso, denso en ocasiones amarillento que tiene como función aislar el interior del útero del ambiente externo (Hafez, 2000 y Senger, 2003).

Si no fue fecundado el oocito y por ende no se encuentra un embrión viable en el útero, entre los días 16 a 19 del ciclo estral se desencadena la activación de los mecanismos luteolíticos, generando una disminución de los niveles de progesterona, mientras que los pulsos de LH comienzan a aumentar su frecuencia (Hernández, 2000 y Palma, 2001). Una vez iniciado el proceso de luteolisis se produce la estimulación del epitelio luminal glandular del útero (Pate, 1994), desencadenando la liberación del principal agente luteolítico como es la prostaglandina F2α (Gordon, 1999). Durante el diestro la progesterona hace que se aumenten las reservas de fosfolípidos y la actividad de la enzima prostaglandina sintetasa, necesaria para convertir el ácido araquidónico en prostaglandina F2α, ya que la presencia de progesterona en los primeros días de dominancia luteal además de preparar el útero para una posible preñez (Ineskeep, 2004), también activa los mecanismos para la producción endometrial de prostaglandina F2α. La PGF2α llega finalmente al cuerpo lúteo haciendo contacto con los receptores de las células luteales y genera la disminución de la producción de progesterona a través de una serie de eventos intracelulares en los que se induce a la muerte celular o apoptosis, permitiendo la regresión del cuerpo lúteo presente para dar paso al inicio de un nuevo ciclo estral (Rodríguez, 2001).

2.2.1. Desarrollo Folicular

Desde hace más de 35 años se está investigando en el patrón de desarrollo folicular en la hembra bovina. Inicialmente se informó que la dinámica folicular se presentaba en dos ondas de desarrollo, la primera iniciando el día 3 y decreciendo

en la mitad del ciclo (día 12), presentando un desarrollo y una subsiguiente regresión; la segunda onda se iniciaba en la mitad del ciclo (día 10 al 13) y terminaba en una ovulación efectiva (Gordon, 1999). Con la ayuda de las técnicas de ultrasonografía se avanzó en el entendimiento del desarrollo folicular ovárico durante el ciclo estral bovino, evidenciándose que pueden presentar dos, tres y rara vez cuatro ondas de crecimiento (Sirois, 1990; Fortune, 1993) este comportamiento ha sido ampliamente estudiado por varios autores pero es clara mente evidenciado en trabajos realizados por Sartori, 2004 en donde realizó un completo seguimiento de la dinámica folicular en novillas Holstein (Figura 1).

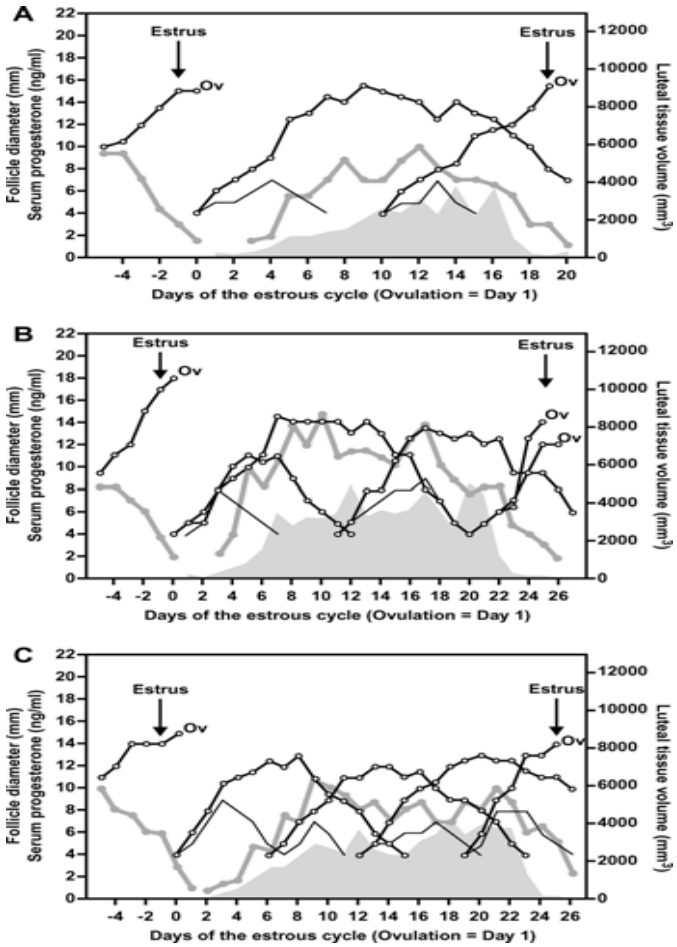


Figura 1. Modelo de los patrones de desarrollo folicular, luteal y perfiles de progesterona durante el ciclo estral bovino **(**Línea negra con puntos blancos: Folículos dominantes. Línea gris con puntos: Desarrollo luteal. Área gris: Concentración plasmática de progesterona. A: Ciclo estral con 2 ondas de desarrollo folicular y ovulación sencilla. B: Ciclo estral con 3 ondas de desarrollo folicular y doble ovulación. C: Ciclo estral con 4 ondas de desarrollo folicular y doble ovulación) (Sartori, 2004)

En cada onda de crecimiento folicular se presentan varias etapas. En la primera un grupo de folículos comienzan a desarrollarse bajo la influencia de las hormonas hipofisiarias (Crowe, 2008), llamada fase de reclutamiento, a continuación se describe una segunda etapa en la que el folículo dominante comienza a crecer más que los otros folículos de su grupo, los cuales se subordinan y recibe el nombre de dominancia (López, 2005); así el folículo dominante que es el de mayor tamaño, en esta etapa presenta un diámetro de 10 o más milímetros, inhibe el crecimiento de los folículos de la cohorte folicular que se encuentran en desarrollo (Hafez, 2000 y Sartori, 2004). En este folículo se produce una mayor síntesis de mRNA que codifica para receptores de hormona FSH, motivo por el que se aumenta la densidad de estos receptores en la superficie de las células del folículo (Rodgers, 1999), permitiendo un mayor desarrollo del folículo dominante. Los niveles circulantes de esta hormona disminuyen y de esta manera se ve afectado el crecimiento de los folículos subordinados pero no del folículo dominante.

Adicionalmente, durante este periodo se produce el incremento de la síntesis de mRNA para la producción de receptores para LH en la superficie del folículo dominante lo que permite que este continúe con su desarrollo hasta la etapa de folículo ovulatorio (Ineskeep, 2004). Es importante tener en cuenta que en estados iniciales del desarrollo folicular, cuando los folículos miden menos de 4 milímetros, no dependen del soporte gonadotrópico de origen hipofisiario, mientras que los folículos mayores de 4 milímetros necesitan de la acción de la hormona FSH para continuar con su desarrollo y de los pulsos de LH que son necesarios para continuar con el crecimiento del folículo de más de 9 milímetros de diámetro; al desarrollarse completamente el folículo dominante se encarga de gran parte de la secreción de estrógeno ovárico durante el estro, esta secreción disminuye rápidamente al presentarse el pico de LH (Gong, 1995 y Crowe, 2008) (Figura 2).

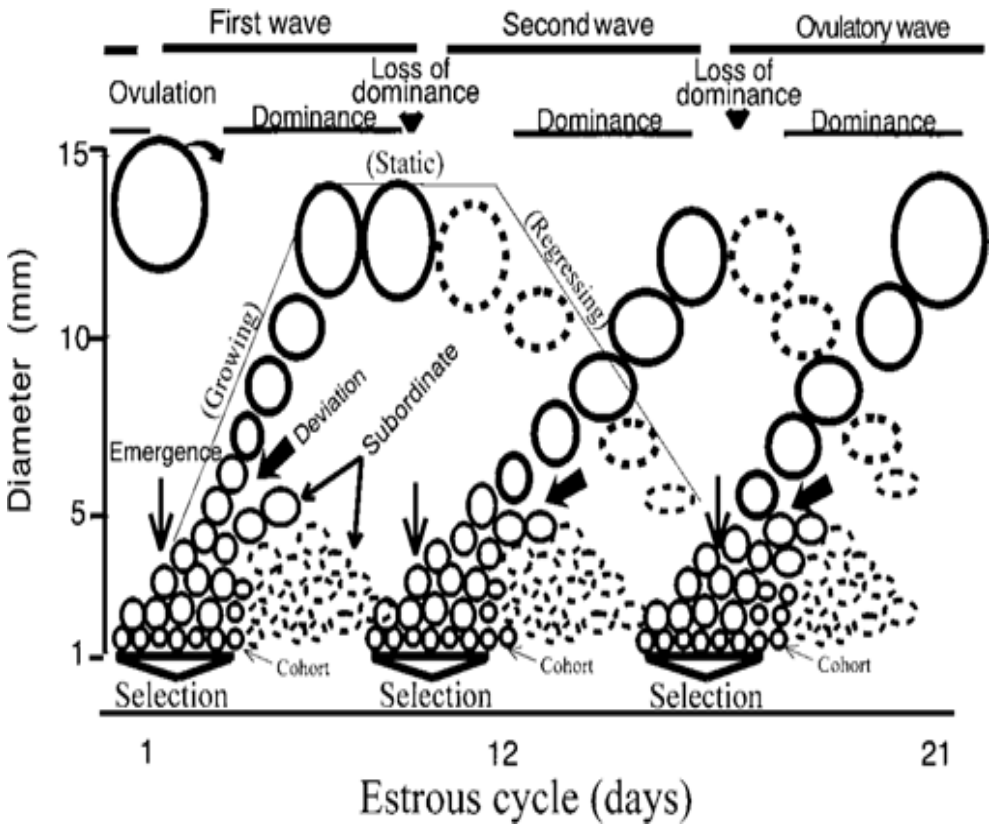


Figura 2. Modelo de la dinámica folicular durante el ciclo estral bovino (Ireland, 2000)

Las ondas de desarrollo folicular son relacionadas estrechamente con la producción y secreción de hormona folículo estimulante, ya que se presenta una elevación en los niveles de esta hormona entre dos y tres días antes de la emergencia de una nueva onda de desarrollo folicular (Adams, 1992 y Ireland, 2000). El patrón de crecimiento folicular durante el ciclo estral, comienza con el desarrollo de un grupo o cohorte de folículos (3 a 6 folículos) después uno de estos alcanza el estado de folículo dominante, haciendo que los demás folículos se subordinen, sufriendo atresia folicular, pero únicamente en la última onda del ciclo el folículo dominante continua su desarrollo hacia la ovulación (Gonzáles, 2001; López, 2005 y Rosales, 2008). El inicio de las ondas se presenta entre los días 1 a 4 y 9 a 12 para los ciclos de dos ondas, mientras que en los ciclos de tres ondas, la tercera inicia hacia el día 16. (Hernández, 2000) (Figura 3).

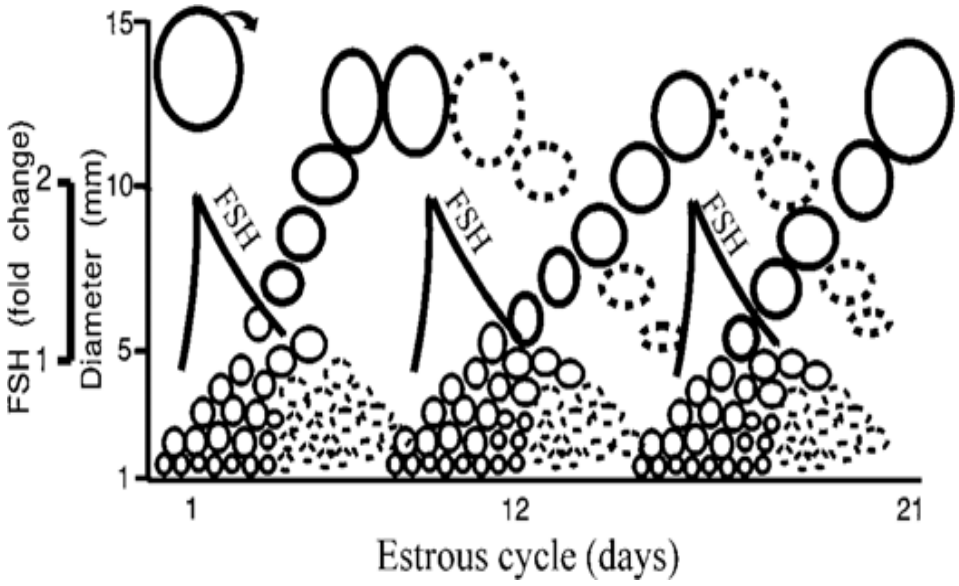


Figura 3. Modelo en el que se relaciona los incrementos transitorios de FSH durante un ciclo estral bovino en el que se presentan tres ondas de desarrollo folicular. (Ireland, 2000)

El sistema de desarrollo folicular se encuentra bajo el control del sistema endocrino y paracrino en el que intervienen las hormonas gonadotrópicas, las citoquinas que actúan como mensajeros químicos, los factores de crecimiento (que favorecen varios procesos como la proliferación celular), los esteroides y otras moléculas reguladoras (Gordon, 1999). El folículo ovárico experimenta una rápida proliferación celular durante su crecimiento temprano, el cual aparentemente es independiente de las gonadotropinas circulantes, pero es susceptible a la acción de los factores de crecimiento; es posible que los agentes ováricos autocrinos y paracrinos regulen el crecimiento folicular (De Moraes, 1997). Los factores de crecimiento son sustancias de origen protéico que actúan por mecanismos autocrinos y paracrinos interviniendo en la actividad mitótica de la célula, desencadenando una proliferación y reorganización de los tejidos, como ocurre en las estructuras transitorias presentes en el ovario. Estos factores pueden clasificarse en grupos. Dentro del primer grupo están los factores que promueven la división y desarrollo celular, el factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF – I), el factor de crecimiento nervioso (NGF), factores de crecimiento epidérmicos (EGF), las Inhibinas y las activinas. Dentro del segundo grupo se encuentran las

citoquinas, las cuales son producidas por los macrófagos y linfocitos, ayudando a la regulación del sistema inmune (Knight, 2001).

El desarrollo folicular inicia desde los folículos primordiales. Estos son formados en el ovario durante la etapa del desarrollo fetal, en donde se encuentran aproximadamente 150.000 folículos primordiales en el momento del nacimiento, pero únicamente logran madurar aproximadamente 100 durante toda la vida de la hembra, los demás son degenerados mediante el proceso de atresia folicular (Gordon, 1999 y Rosales, 2008).

En el desarrollo embrionario los folículos primordiales se establecen en el ovario durante la vida fetal de la hembra; estos están compuestos por un oocito rodeado de un estrato celular que forma el epitelio folicular escamoso, todos provenientes de la especialización de las células germinales primordiales que proliferan por medio del mecanismo de replicación celular o mitosis.

El estadio de folículo secundario es caracterizado por la formación de nuevos estratos celulares, así como por la aparición de un material de origen proteico denso que rodea al oocito, denominado zona pelúcida; además de la formación de gránulos corticales en el citoplasma del oocito. A partir de este momento los folículos aumentan su sensibilidad de manera gradual a la estimulación de las gonadotropinas de origen hipotalámico, ya que inicia la síntesis de RNA por parte del oocito (Fortune, 2004). La liberación de gonadotropinas hipofisiarias, es dependiente de la secreción pulsátil de la GnRH en el hipotálamo, así como de la cantidad de receptores de GnRH presentes en la superficie de los gonadotropos y de los efectos moduladores de los esteroides gonadales (estrógenos y progesterona) y péptidos (activina, inhibina y folistatina) (Padmanabhan, 2001).

La GnRH es liberada por un grupo de células especializadas ubicadas en el núcleo arqueado del hipotálamo basal medio.

Una vez liberadas, las hormonas gonadotropinas son transportadas por la circulación y llegan al ovario en donde se encuentran los folículos en desarrollo,

los cuales inician gradualmente su sensibilidad a la acción de estas hormonas; en estos folículos se distingue un oocito rodeado por la zona pelúcida y en la periferia varios estratos de células de la granulosa ya desarrollados, los cuales comienzan a avanzar a la etapa terciaria temprana del desarrollo folicular. En este momento el oocito presenta un núcleo completamente activo con la capacidad de realizar el proceso de transcripción, debido al desarrollo completo del retículo fibro-granular nuclear. Este estadio es alcanzado por la acción de la FSH, que junto a la acción de los factores de crecimiento, presentes también durante las etapas anteriores, favorecen la mitosis de las células de la granulosa folicular. Durante esta etapa ocurre una proliferación, diferenciación y especialización de las células que rodean el oocito, permitiendo evidenciar claramente las células de la teca interna, externa, lámina basal y células del cumulus. Adicionalmente se genera un espacio por el aumento de presión ejercida por el líquido folicular, ya que el plasma periférico al folículo comienza a ingresar por mecanismos de transudación a través de su lámina basal, haciendo que se aumente la presión intrafolicular; este espacio recibe el nombre de antro folicular, cuya formación es mediada por la FSH, el EGF y el IGF-I, entre otros (Crowe, 2008). El líquido folicular es un transudado sérico, constituido por un serie de sustancias importantes para el desarrollo del folículo, como lo son las proteínas (albúmina, globulinas, inmunoglobulinas, fibrinógeno, lipoproteínas y péptidos), aminoácidos (Aspargina, treonina, glutamina, glutámico, alanina y glicina), carbohidratos (glucosa, fructosa, mucosa, galactosa y manosa), gonadotropinas (FSH, LH), esteroides (colesterol, andrógenos, progestinas, estrógenos), prostaglandinas (E, I y F2α), minerales y sales (Na, K, Mg, Zn, Cu, Ca, S, Cl, P), inmunoglobulinas (IgA, IgG). Los folículos más grandes, (mayores de 9 mm) también acumulan en el líquido folicular sustancias no esteroideas como el inhibidor de la maduración de los oocitos, inhibidor de la luteinización, relaxina e inibina. El líquido folicular favorece la maduración nuclear y citoplasmática del oocito, regulando las funciones de las células de la granulosa, favoreciendo el crecimiento folicular y el proceso de esteroideogenesis, además de intervenir en la ovulación y el transporte del ovulo al útero y se une con secreciones uterinas para favorecer el ambiente de capacitación espermática y desarrollo embrionario

temprano, además de preparar el folículo para la posterior formación del cuerpo lúteo (Hafez, 2000).

La etapa preantral del desarrollo folicular puede dividirse en tres estados, la activación de los folículos primordiales, la transición de folículo primario a secundario y el desarrollo del folículo secundario hacia la etapa periantral. Durante la etapa antral del desarrollo folicular se evidencia una cohorte de folículos en crecimiento, que es regulada por los mecanismos de selección, dominancia y atresia folicular (Fortune, 2003).

Es importante tener en cuenta que estos folículos son completamente funcionales ya que producen estrógenos, necesarios para inducir la liberación hipotalámica de GnRH, desencadenando la secreción de FSH y LH (Ineskeep, 2004), necesarias para continuar con el desarrollo folicular, así como otros productos que intervienen en el desarrollo como son la activina, inhibina, folistatina, entre otras; el incremento en la secreción de estrógenos de origen ovárico es decisivo para permitir el desarrollo folicular y la ovulación (Markström, 2002).

La dominancia folicular es el proceso por el cual uno de los folículos de la cohorte, que están presentando un desarrollo similar, aumenta su tamaño, convirtiéndose en dominante con respecto a los otros folículos que pasan a ser subordinados (folículos que sufren regresión); incluso los folículos dominantes de las ondas previas se subordinan ante la presencia del folículo dominante de la última onda de desarrollo folicular, que continua su diferenciación y crecimiento, hasta llegar a ser folículo ovulatorio (Ineskeep, 2004 y Sartori, 2004). Este folículo presenta una mayor densidad de receptores de gonadotropinas (FSHr y LHr) en la superficie de las células de la granulosa, mayor producción de enzimas y proteínas que intervienen en la esteroideogenesis, así como la mayor concentración de estradiol en el fluido folicular, motivo por el cual hay un incremento en el desarrollo del folículo dominante con respecto a los folículos subordinados, también mediado por los factores de crecimiento (Sánchez, 1993 y Fortune, 2003). Uno de los principales agentes asociados al proceso de dominancia folicular es el sistema del IGF, compuesto por los dos ligandos IGF-I e IGF-II, los receptores tipo I y II, y las

proteínas de unión denominadas IGFBP-I, II, III, IV, V y VI. Los IGFs favorecen la estimulación de la proliferación celular y al actuar de manera sinérgica con las gonadotropinas promueven la diferenciación de las células foliculares, favoreciendo el desarrollo para dar paso a la dominancia folicular (Crowe, 2008).

Los folículos subordinados inician el camino hacia la regresión, en la que interviene el mecanismo de apoptosis celular, que es necesario para la homeostasis tisular y ocurre en todas las células de los organismos multicelulares como un proceso fisiológico. En los folículos en crecimiento la apoptosis puede presentarse durante cualquiera de las etapas de desarrollo, en las que se presentan cambios substanciales celulares en el citoplasma (sin un aumento importante en el volumen citoplasmático, ni la subsiguiente lisis, como se aprecia en la necrosis) y en el núcleo (compactación de la cromatina) (Markström, 2002).

El inicio del proceso de apoptosis es desencadenado en respuesta a la activación de genes proapoptoticos; estos codifican para las caspasas (procaspasas), que son enzimas con una fuerte actividad proteolítica, y los genes de la familia Bcl-2, dentro de los que se encuentran Bcl-XL, Bcl-w, Bid, Bax, Bik, Bcl-Xs. Las caspasas están activadas en forma de zimógenos que se encuentran inactivos y deben ser activadas para actuar; por medio de la activación de una caspasa por otra, por la unión de cofactores y coenzimas que producen la activación; ó por la activación generada por los receptores de muerte celular. De esta forma se desencadena la actividad de un grupo de enzimas que degradan el DNA, conocidas como DNasas, las cuales son endonucleasas que producen una defragmentación internucleosomal del DNA, haciéndolo perder su patrón característico (Flores, 2005 y Rosales, 2008).

Se han propuesto tres mecanismos de regulación de la apoptosis. El mecanismo hormonal (gonadotropico y esteroidal) que junto con los factores locales ó tróficos (EGF, FGF, IGF e insulina); cumplen un papel importante en la regulación de la apoptosis ya que favorecen la supervivencia celular, actuando como mecanismo anti-apoptótico, el cual es totalmente dependiente de la expresión de los receptores, para estos factores en las células (Hacker, 2000; Markström, 2002;

Johnson, 2003). El segundo mecanismo de regulación de apoptosis es dependiente del gen p53, el cual es inducido por alteraciones y daños presentes en el DNA, que desencadena la activación de los genes proapoptóticos como el Bax, desencadenando la cascada de de reacciones apoptóticas (Slot, 2006). Un tercer mecanismo de inducción de la muerte celular por apoptosis se da por la inducción de la vía Fas, la que hace parte de una serie de mecanismos de tipo inmunológico, ya que al hacer contacto el Fas con su receptor de membrana celular, permite la activación de de los genes pro-apoptóticos pertenecientes a la familia Bcl-2 (Johnson, 2002; Flores, 2005 y Slot, 2006).

2.2.2. Mecanismo de Ovulación

Una vez el folículo dominante presenta sus componentes completamente desarrollados y libera las cantidades de estradiol necesarias para sus funciones (estrógeno-activo), pasa a la etapa de folículo preovulatorio, que es la etapa en la que se prepara para el fenómeno de la ovulación ó liberación del oocito.

La maduración del folículo preovulatorio depende de la interacción de sustancias como las gonadotropinas, hormonas esteroides, factores de crecimiento, entre otros. Los incrementos plasmáticos de estradiol, preceden al incremento transitorio en la liberación de LH (Sánchez, 1993); como los folículos preovulatorios presentan un incremento en el número de receptores para LH, éstos van a ser susceptibles de esta elevación transitoria en la concentración de LH en sangre, proceso por el cual se produce la activación de la adenilciclasa para producir AMPcíclico (AMPc) intracelular, activando la señal de transducción para la proteína quinasa A (PKA). Además los receptores de LH ya conjugados con la LH pueden utilizar un segundo mensajero como el inositoltrifosfatado y el Calcio para producir la activación de la proteinquinasa C (Rosenfeld, 2001). El incremento transitorio de LH (pico preovulatorio de LH), genera el incremento en la síntesis de mRNA que codifica para los receptores de progesterona, ciclooxigenasa-2 (COX612) y factor regulador de crecimiento temprano (Egr-1) los cuales son indispensables en el proceso de ovulación, favoreciendo el rompimiento del folículo por un área específica y la extrusión del oocito maduro (Richards, 2005 y

Crowe, 2008). En la superficie del folículo, en donde se produce la ovulación, pueden distinguirse varios estratos celulares, caracterizados por una capa superficial simple de epitelio ovárico, la túnica albugínea (compuesta por tejido conectivo) y la teca externa envuelta por una red colágena que provee firmeza a la pared folicular, la teca interna y finalmente la capa de células de la granulosa separada por la lámina basal del complejo cumulus-oocito (Ohnishi, 2005).

En el folículo se inicia la expansión del complejo cumulus-oocito debido a la acción de glicosaminoglicanos (acido-β1, 3-N-acetilglucosamina β-1,4-glucurónico) producidos en las células del cumulus y que tienen como función aumentar la presión intrafolicular (Richards, 2005). Además se desencadena la síntesis de mRNA que codifica para el factor de necrosis tumoral-α, que permite la activación de una serie de proteinasas desencadenantes de los mecanismos proteolíticos en la matriz extracelular (Hunter, 2004). Las proteinasas que intervienen en los procesos proteolíticos son clasificadas así: el primer grupo, está compuesto por las pertenecientes a la matriz de metaloproteinasas (MMPs) (aprox. 23 MMP); el segundo grupo, está conformado por serinas como es el caso del activador del plasminógeno y la plasmina; el tercer grupo, está compuesto por desintegrínas y trombospondinas; finalmente, está el grupo de la proteína morfogénica del hueso 1, la catepsina-L y las proteínas plasmáticas asociadas a la preñez (Ohnishi, 2005). Al activarse, éstas proteinasas van a actuar sobre los estratos celulares y la red colágena que brinda soporte a los tejidos de la pared folicular, causando su adelgazamiento y pérdida la tensión. La activación de las proteinasas que componen la matriz de metaloperoxidasas entre ellas MMP-2, MMP-14 y MMP-23, sintetizadas en las células de teca, producen la liberación de colagenasas y gelatinasas la cuales desencadenan el efecto proteolítico generando la ruptura de la pared (Richards, 2005), esto sumado al proceso inflamatorio agudo que genera un aumento en la despolarización en las células del folículo y los cambios en la concentración en el citosol celular del calcio van a favorecer el proceso de ovulación (Spey, 2006).

Una vez se produce la ruptura del folículo el oocito es liberado y es captado por las fimbrias del oviducto, las cuales se encuentran dispuestas hacia el ovario, gracias a la acción estrogénica. En el ovario, el espacio vacío del folículo ovulado llenado rápidamente de sangre, originando una estructura transitoria denominada cuerpo hemorrágico, como preámbulo a la formación y consolidación del cuerpo lúteo (Hunter, 2004).

2.2.3. Formación y Consolidación del Cuerpo Lúteo

El cuerpo lúteo funciona a manera de una glándula endocrina transitoria, altamente irrigada, cuya principal acción es la producción de la hormona progesterona, la que favorece la formación de un adecuado medio ambiente uterino, permitiendo que ocurran las primeras etapas del desarrollo embrionario y después desencadenar el reconocimiento materno de la gestación (Kastelic, 1990; Grygar, 1997; Bridges, 2000 y Schams, 2004); al no producirse ésta interacción entre la madre y el embrión, se da paso a un nuevo ciclo estral debido a la activación de los mecanismos luteolíticos, que generan la involución tanto estructural como funcional del cuerpo lúteo, permitiendo una nueva etapa de dominancia folicular así como la siguiente ovulación (Starbuck, 2004 y Hernández, 2008).

Una vez liberado el oocito y el líquido que se encontraban en el antro folicular, se inicia una llegada masiva de sangre al sitio de ovulación; estos cambios hemodinámicos locales intervienen en la remodelación que ocurre durante la transición de estructuras ováricas, ya que al formarse un cuerpo lúteo va a producirse una importante neovascularización (angiogénesis) y una diferenciación de las células que estaban presentes en el folículo (luteinización), durante el pico de LH y la formación temprana del cuerpo lúteo (Schams, 2004). Al inicio de la luteinización las células de la teca folicular sufren un proceso de hiperplasia e hipertrofia, para generar las células luteales pequeñas; mientras que las células de la granulosa folicular van a dar paso a las células luteales grandes, disminuyendo así la capacidad para producir andrógenos y estrógenos al disminuir la síntesis de

mRNA que codifica para las enzimas P450 17α-hidroxilasa (17α-OH) y la 3β-hidroesteroide-deshidrogenasa (3β-HSD) (Acosta, 2003).

El cuerpo lúteo bovino está compuesto por células luteales grandes, pequeñas, varios tipos de células endoteliales, musculatura lisa, macrófagos, leucocitos y ocasionalmente algunas células plasmáticas, cuya función es la secreción de progesterona, y en pequeñas cantidades, estradiol, prostaglandinas y hormonas peptídicas, como relaxina, oxitocina, neurofisina-I, vasopresina e inhibina (Grygar, 1997; Niswender, 2002 y Sangha, 2002). El mecanismo por el cual se produce la remodelación del componente celular folicular, incluye hipertrofia de las células foliculares, hiperplasia de los fibroblastos que componen el tejido conectivo y aumentos en el aporte sanguíneo. Está también acompañado por cambios en la matriz extracelular, diferenciación, mitosis y migración celular; controlados por la expresión de genes que codifican para dos familias de proteínas involucradas en cada uno de estos procesos y factores de crecimiento como el EGF, bFGF, IGF, el factor de crecimiento angiogénico (AGF), entre otros (Schams, 2004). Esta remodelación funcional y estructural de la matriz extracelular es claramente influenciada por la acción de las metaloproteinasas y del plasminógeno activador de plasmina, activados por la disminución en la síntesis de mRNA que codifica para las proteasas inhibidoras de estos factores, como la TIMP y la α2-macroglobulina, una vez ocurrida la ruptura folicular (Acosta, 2004). Durante la etapa final del desarrollo folicular se generan cambios hemodinámicos que disminuyen el aporte sanguíneo ovárico pos-ovulación; entre 2 y 5 días después de la ovulación el flujo sanguíneo se incrementa notoriamente correlacionándose con el aumento del volumen lútea y las concentraciones sanguíneas de progesterona debido a la angiogénesis que se está produciendo en el cuerpo lúteo, lo que genera la diferenciación de las foliculares en células luteales (Schams, 2004).

Una vez establecidas las células luteales grandes y pequeñas se crean uniones intercelulares que permiten el intercambio de elementos entre las células, importantes para la regulación del crecimiento, diferenciación y regresión luteal;

estos canales son inducidos por la acción de las gonadotropinas hipofisiarias (FSH y LH), así como de sus receptores (Chabbert-Buffet, 2000). Las células luteales ya formadas, incrementan su contenido de lípidos, colesterol y esteres; pero también incrementan la actividad de las enzimas 5-3β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa, así como de la succinato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, isocitrato-deshidrogenasa, malato-deshidrogenasa y fosfatasas, para poder efectuar la biosíntesis hormonal durante la fase luteal. De esta manera, la LH llega por vía circulatoria al cuerpo lúteo que se encuentra altamente irrigado.

2.2.4. Reconocimiento Materno Post-trasplante y Activación de Mecanismos Luteotrópicos

La eficiencia en la técnica de TE, se ve afectada por muchos factores, entre ellos los que están asociados a la hembra receptora de embriones, por este motivo es muy importante hacer un control eficaz de los factores que puedan causar variabilidad en los resultados positivos tras la aplicación de esta técnica, representados en preñeces (Kastelic, 1990; González, 2001; Spell, 2001 y Vasconcelos, 2006). Es importante hacer un seguimiento de las estructuras ováricas presentes en la hembra durante el protocolo de sincronización, ya que evaluando los tamaños del folículo y del cuerpo lúteo, previos a TE, puede tenerse una idea clara de los niveles de producción de progesterona para de esta forma poder hacer una selección de las hembras que van a ofrecer un óptimo medio uterino al embrión que van a recibir (Kastelic, 1990; Bridges, 2000; Vasconcelos, 2001; Baruselli 2001; Spell, 2001; Sartori, 2002; Duica, 2007 y Gonella, 2010).

Durante la etapa embrionaria temprana (antes de la implantación del conceptus) el embrión migra a lo largo de la luz uterina, por lo que es importante que el epitelio uterino no permita el adosamiento embrionario antes de tiempo; de esta manera, desencadena la síntesis de mRNA que codifica para las proteínas antiadherentes en las células del epitelio luminal uterino, así se produce la expresión de las glicoproteínas mucinas entre las que presentan una mayor acción las MUC-1 y MUC-4, estas proteínas van a estar presentes en la superficie luminal uterina hasta los días 15-16 cuando los niveles de estas inician su descenso para permitir

que inicie la etapa de implantación. Las mucinas 1 y 4 recubre las células de la pared uterina para bloquear la unión temprana entre el trofoectodermo y los receptores de las proteínas de múltiple adhesión como las integrinas, evitando que se genere una implantación temprana (Spencer, 2007).

Los mecanismos de mitosis celular ocurridos en las células, así como el aumento de la presión ejercida por el fluido contenido en el blastocele y la acción de las enzimas que desnaturalizan la zona pelúcida (barrera protectora embrionaria), permiten que el blastocisto eclosione; es entonces cuando el conceptus (embrión con sus membranas asociadas) comienza a tener contacto directo con el medio uterino, el cual es un periodo crítico, ya que del día 8 al 17 ocurre aproximadamente un 30-40% de las pérdidas embrionarias. El establecimiento satisfactorio del embrión es producto de la interacción entre éste con sus membranas asociadas y el endometrio de la hembra receptora, logrado mediante el proceso denominado reconocimiento materno de la preñez, el cual es indispensable para el subsecuente.

El reconocimiento materno de la preñez se evidencia como el periodo crítico en el que el embrión “envía señales” de su presencia a la madre antes de iniciarse el proceso de regresión del cuerpo lúteo, para así mantener la integridad funcional y estructural del mismo, desencadenando una serie de cambios uterinos que favorecen el establecimiento de la gestación, este mecanismo es generado por la síntesis y secreción de interferón Tau por parte del embrión, lo cual es considerado como un importante factor luteotrópico (Rodríguez, 2001; Rodina, 2009 y Tovio, 2010).

La supervivencia embrionaria temprana depende de la no reacción de rechazo inmunológico por parte de la madre al conceptus, de un medio ambiente uterino favorable para el desarrollo embrionario, de la programación genética intrínseca de embrión (Hernández, 2008 y Tovio, 2010) y también es de gran importancia la no presencia de microorganismos en el medio uterino que puedan generar mortalidad embrionaria durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario. Una vez eclosionado de su zona pelúcida el embrión junto a todas sus membranas

sufren un desarrollo vertiginoso, en el que se elongan, ocupando gran parte de la superficie uterina, mecanismo que es dependiente de una serie de factores de crecimiento entre los cuales se resalta el TGF-β y el VEGF (Hernández, 2008). Al tener contacto el conceptus, con el fluido uterino presente en el espacio luminal uterino, compuesto por derivados del suero sanguíneo que aporta electrolitos, sustratos energéticos y productos específicos que permiten aumentar la posibilidad de supervivencia del embrión durante la etapa inicial del desarrollo embrionario va a iniciarse la producción de la señal primaria por parte del conceptus hacia la madre, que va a tener un papel decisivo en el mecanismo del reconocimiento materno de la preñez.

Al llegar el conceptus al día décimo del desarrollo las células del trofoblasto inician la secreción la proteína trofoblastica bovina, denominada también Interferón Tau, presentando una máxima producción entre los días 13 al 23.

Es importante que se produzca una elongación del conceptus para que se presente el reconocimiento materno, ya que al haber una mayor superficie trofoblástica, un número mayor de células van a sintetizar una mayor cantidad de interferón por acción de los genes para la síntesis de interferón (ISGs). De esta manera, al desarrollarse el conceptus se incrementa la síntesis de mRNA que codifica para interferón Tau, el cual hace contacto con los receptores para interferón (IFANAR) presentes en las células del epitelio glandular y luminal uterino generando la fosforilación cruzada y activación de quinasas, que producen la activación para señal de transducción y activación de transcripción 1 y 2 (STAT 1 y 2); por otra parte la estimulación producida por la unión del interferón Tau a su receptor, interviene directamente en la expresión del factor estimulante de transcripción de interferón 3γ (ISGF 3γ), que favorece para la síntesis e hiper-activación de los elementos que responden a la estimulación del interferón (ISRE), como STAT1, STAT2, ISGF3G, B2M, ISG15, MIC, OAS, los cuales intervienen en la síntesis de las proteínas que favorecen el mecanismo de implantación del conceptus (Roberts, 1999 y Spencer, 2007).

Una vez ocurrida la fecundación del oocito y activada la cascada de los mecanismos luteotrópicos del útero, se produce un aumento en la capilaridad asociado a la producción de progesterona; esto estimula a las células del epitelio luminal y glandular endometrial para sintetizar varios tipos de moléculas, como enzimas, factores de crecimiento, citoquinas, linfoquinas, hormonas, proteínas transportadoras y otras sustancias histotropas, entre las que se evidencian los TGF-α, β1, β2, β3, PDGF, IGF tipo I y II, factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF), factor estimulador de colonias (CSGF), EGF, FGF, TNGF-α, interleuquina 1,3,6 (IL-1,3,6,), factor inhibidor de la leucemia, además de un gran número de proteínas como la proteína con reactividad cruzada con la ubicuitina (PRC-U), la proteína 2 quimiotáctica granulocítica, proteínas de la leche uterina (UTMP), serpinas uterinas (US), osteopontínas (OPN), entre otras. Así, los factores de crecimiento van a unirse al Heparán Sulfato Proteoglicán (HSPG) en el glicocálix del epitelio uterino para brindar unas características adecuadas a éste, que permiten favorecer un adecuado desarrollo embrionario, reconocimiento por parte de la madre, implantación, y mantenimiento de la gestación. Así mismo, por acción hormonal se disminuye el tono de la musculatura lisa uterina que facilita la adherencia del embrión, previniendo pérdidas embrionarias tempranas (Bowen, 2000).

2.2.5. Mecanismo de Implantación Embrionaria

Una vez dadas las condiciones uterinas y hormonales (que integran las señales endocrinas y paracrinas) generadas por la madre y el conceptus, que favorecen la activación de los mecanismos luteotrópicos; y después de producirse la elongación de la estructura embrionaria, con la subsiguiente liberación de la proteína trofoblástica bovina (sin generarse rechazo inmunológico materno, ni expresarse alteraciones genéticas embrionarias), se inicia el mecanismo de implantación embrionaria que termina con el adosamiento del conceptus al epitelio uterino materno, generándose una comunicación recíproca entre éstos.

Al producirse el acercamiento entre el trofoectodermo y la pared luminal uterina, se desencadena el mecanismo de implantación, en el cual se distinguen

claramente cinco eventos que terminan con la unión entre estas estructuras (Spencer, 2007). Durante la primera etapa se produce la eclosión del blastocisto de la zona pelúcida la cual se produce aproximadamente el día 8 post-fertilización.

Inmediatamente después (días 9-11), se genera el precontacto y orientación del blastocisto, en esta etapa se produce un cambio importante en la morfología del conceptus, ya que cambia de forma esférica a tubular y migra hacia la región media del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo; por lo cual es de gran importancia la acción de las glicoproteínas antiadherentes mucina 1 y 4 (MUC-1 y MUC-4), durante esta etapa. Ya para el día 11, inicia la disminución en la secreción de las mucinas, dando paso a la aposición del trofoblasto elongado, a la pared uterina. Una vez producido el adosamiento entre estas estructuras, inicia la síntesis de mRNA que codifica para la síntesis de las integrinas, las cuales son sustancias de origen protéico producidas en las células del epitelio uterino y en las células del trofoectodermo que tienen por función facilitar el proceso de implantación embrionaria. Entre los días 15 y 16 se inicia la cuarta etapa del mecanismo de adhesión del conceptus al epitelio endometrial; durante este periodo se inicia el proceso de transcripción de los genes que codifican para las proteínas de múltiple adhesión en las células del epitelio glandular endometrial, entre las que presentan una mayor acción la molécula glicosilada para la adhesión celular-1 (GLYCAM-1), la galectina- 15 (LGALS-15) y la fosfoproteína-1 (SPP-1) también denominada osteopontina, CTS1, CTS3, CTSL, STC1, fibronectina de unión, fibronectina oncofetal, vitronectina, tenascina, factores de Von Willebrand y las serpinas, entre otras. La producción de estas proteínas está directamente influenciada por acción progestágena, las cuales se unen a sus receptores de membrana pertenecientes al grupo de integrinas y glicoconjugados presentes en el extremo apical de las células del trofoectodermo y de las células del epitelio luminal uterino, para facilitar la adhesión de estas estructuras, además de regular el desarrollo del conceptus durante la fase de implantación; las integrinas presentes durante las etapas del proceso de implantación presentan varias subunidades como la β1, α3, α6 y αvβ3, entre otras, que intervienen favoreciendo el adosamiento (conceptus-útero).

Una vez ocurrida esta etapa, hacia el día 20 a 25, se desencadena la quinta fase del mecanismo de implantación, en la que se evidencia la invasión celular endometrial, así como la estimulación de las células mononucleares del trofoblasto para especializarse formando las células binucleadas gigantes, las cuales migran y se fusionan con las células del epitelio luminal, transformando el estrato simple del epitelio luminal endometrial en una placa sincitial de células híbridas fetomaternas trinucleadas. Estas pueden unirse en grupos celulares, por medio de uniones estrechas, para desarrollar los sitios de unión feto-maternas, permitiendo el crecimiento del cotiledón en los placentomas, los cuales son indispensables para el paso de sangre oxigenada, sustancias y nutrientes de la madre al feto pero también para drenar del feto las sustancias de desecho (Spencer, 2007 y Hernández, 2008).

Durante esta fase, llamada de invasión endometrial, las células experimentan una serie de transformaciones, mediadas por la síntesis de mRNA que codifica para las sustancias activadoras de cada uno de estos cambios estructurales, entre las que toma una gran importancia la hialuronidasa-2 (HYAL-2), intra y extra celular, la cual es una proteína glicosilfosfatidilinositól de anclaje, que intracelularmente interviene en la diferenciación de las células trofoblasticas binucleadas, pero en el componente extracelular se ubica en la superficie celular permitiendo la unión celular durante la fase de implantación embrionaria (Bowen, 2000 y Spencer, 2007).

Las células binucleadas además de la formación de los puntos de unión fetomaternas, también se encargan de sintetizar y secretar proteínas y hormonas esteroideas como la hormona somatomamotropica coriónica-1 (CSH-1), también conocido como lactógeno placentario, las glicoproteínas asociadas a la preñez (PAGs) y la progesterona, las cuales se unen a sus receptores y a los receptores de prolactina ubicados en las glándulas uterinas estimulando el crecimiento y diferenciación celular durante la gestación. A continuación de este proceso se sintetiza una mayor cantidad de receptores para prolactina en las células del epitelio glandular endometrial, en las que al hacer contacto con el respectivo

ligando y bajo la acción de hormonas lactogénicas y somatogénicas, se inicia un proceso de hipertrofia y diferenciación de las células endometriales, acompañado por la expresión de los genes para la producción de proteínas presentes en la leche endometrial, como el αvβ3 que codifica para una serie de integrinas (heterodimeros), entre las que se encuentran la fibronectina de unión, fibronectina oncofetal, vitronectina, osteopontina, tenascina y factores de Von Willebrand, entre otros estos que favorecen el crecimiento del conceptus, su desarrollo e implantación. De la misma forma una de las proteínas de mayor secreción uterina durante esta etapa es la osteopontina, la cual es una fosfoproteína sintetizada por las células del epitelio glandular, gracias a la estimulación ejercida por la progesterona al ser liberada en el lumen uterino, va a ubicarse en la superficie apical del epitelio luminal endometrial, del epitelio glandular y también en la superficie del trofoectodermo. La osteopontina se une a las integrinas presentes en la superficie del trofoectodermo y también a las de la superficie de las células del epitelio luminal uterino produciendo la unión entre éstas; además, la osteopontina puede formar puentes bi-funcionales con las integrinas utilizando otros receptores superficiales en las células del epitelio uterino y del trofoectodermo, los cuales se estabilizan por medio de la transglutaminación de estas proteínas, consolidando la unión entre el útero y el conceptus. En este proceso también interviene de manera importante la molécula glicosilada para la adhesión celular-1 (GLYCAM-1), la cual pertenece al grupo de las mucinas, actuando como mediador en la adhesión celular endotelial; ya que actúa como ligando específico en los receptores ubicados en las células del epitelio uterino y del trofoectodermo, desencadenando la activación de las proteínas de adhesión (integrinas), produciendo una unión estable conceptus-epitelio uterino (Spencer, 2007).

2.2.6. Activación de Mecanismos Luteolíticos

Al no desencadenarse la cascada de mecanismos luteotrópicos, mediados por el interferón Tau, se inicia la activación de los mecanismos luteolíticos que tienen como finalidad la regresión funcional y estructural del cuerpo lúteo. La interacción

entre la progesterona, los estrógenos y la oxitocina, así como de sus respectivos receptores, entre otros factores, permiten que el epitelio endometrial sintetice el principal agente inductor de la lisis del cuerpo lúteo, que es la prostaglandina F2α.

Esta se dirige por vía circulatoria al cuerpo lúteo, para generar la acción luteolítica, que consiste en desencadenar la apoptosis ó muerte celular controlada de las células que componen esta estructura (Barnea, 2000).

La acción de la progesterona en el endometrio durante el ciclo estral, es necesaria para la producción uterina de la prostaglandina F2α, ya que al disminuir las concentraciones plasmáticas de progesterona, se induce un aumento en los niveles de fosfolípidos, así como el incremento en la síntesis de la prostaglandina sintetasa que es una de las enzimas que intervienen en la transformación del ácido araquidonico en prostaglandina F2α. También el estradiol y la oxitocina juegan papeles decisivos en la síntesis y liberación de prostaglandina. El mecanismo por el que se produce la síntesis y liberación de prostaglandina F2α por el epitelio uterino depende de la interacción entre el cuerpo lúteo, los folículos ováricos, el útero, el encéfalo, así como de una serie de productos, entre los que se encuentran las hormonas, los factores de crecimiento, entre otros (Hernández, 1998).

La regresión del cuerpo lúteo se inicia con la disminución en la síntesis de progesterona, la cual recibe el nombre de regresión funcional. Durante el inicio de esta etapa no de evidencian aun las alteraciones morfológicas de las células luteales que ocurren durante la etapa de la regresión estructural del cuerpo lúteo.

Hacia los días 16 a 17 del ciclo estral, al no haber un estímulo luteotrópico de origen embrionario, van a desencadenarse una sumatoria de factores que favorecen la secreción de PGF2α, produciendo la regresión estructural del cuerpo lúteo (luteolisis), dando paso a un nuevo ciclo estral, dichos factores se encontraban controlados, ya que la progesterona sintetizada y liberada por el cuerpo lúteo generaba un efecto inhibitorio sobre la secreción de PGF2α, que

afectaba la síntesis del mRNA que codifica para la síntesis de los receptores de oxitocina (Hernández, 1998 y Goff, 2004).

Por otra parte las ondas de desarrollo folicular continúan a lo largo de la etapa luteal. Así, para esta etapa del ciclo estral los folículos en crecimiento sintetizan y liberan estradiol, el cual hace contacto con sus receptores hipotalámicos, ubicados en el núcleo supraóptico, produciendo la síntesis de la hormona oxitocina; esta viaja por el eje hipotálamo-hipofisiario para ser almacenada en la neurohipófisis, en donde es liberada bajo la influencia del estradiol. Así mismo el estradiol estimula la síntesis de mRNA que codifica para receptores de oxitocina en las células que componen el epitelio uterino, generando un incremento en el número de los receptores a este nivel, los cuales hacen contacto con su ligando para permitir la síntesis de prostaglandina. Sumado a esto, el incremento en los niveles de estradiol estimula las células del epitelio glandular y luminal uterino para la síntesis de enzimas como la fosfolipasa A, C y cicloxigenasas, que tienen un efecto primordial en la síntesis de la prostaglandina F2α. Al producirse la fosforilación enzimática ejercida por la proteinquinasa C de las proteínas que hacen parte del citoesqueleto, se genera la remodelación de éste generando el desplazamiento de gránulos de oxitocina hacia la membrana celular, con la subsiguiente liberación de oxitocina, la cual favorece la síntesis de PGF2α (Olivera, 2007).

La PGF2α se une a sus receptores que se encuentran presentes en la superficie de las células esteriodeogénicas luteales grandes, los cuales pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G. al producirse la unión entre éstos y su ligando (PGF2α), se activa la fosfolipasa C por medio de la proteína G, permitiendo que ésta catalice la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato en inositól 1, 4, 5 trifosfatado (IP3) y 1,2-diacilglicerol. Al incrementarse la producción IP3, se une a los receptores presentes en el retículo endoplasmático liso desencadenando la liberación de Calcio intracelular, que estimula la actividad catalítica de la proteinquinasa C, dependiente del Calcio, la cual genera una acción antiesteriodeogénica por la modificación postransicional de las proteínas

celulares que intervienen en la esteroideogenesis. También se afecta la biodisponibilidad de colesterol intracelular y se altera la matriz extracelular de las células luteales (Niswender, 2000). Así mismo, al unirse la PGF2α con su receptor puede activar la proteinquinasa C, por medio de esteres de forbol, desencadenando la serie de reacciones luteolíticas que es mediada por las fosforilaciones secuenciales de proteinquinasa activada por mitógenos, que finaliza con la inhibición de la trascripción del mRNA para la proteína reguladora de la esteroideogenesis, afectando la señalización para la producción de progesterona (Olivera, 2007).

Los cambios estructurales en las células luteales grandes y pequeñas comienzan a evidenciarse después de 24 a 36 horas de la exposición luteal a la prostaglandina, pero ya para esta etapa la actividad esteriodeogénica está ampliamente reducida; así mismo las células endoteliales que conforman la intrincada red de capilares del cuerpo lúteo, son las primeras que presentan importantes alteraciones morfológicas, produciendo la activación del fenómeno de apoptosis celular (Goff, 2004).

La apoptosis, también conocida como “muerte celular programada” se produce por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos. Durante el proceso de apoptosis se evidencia el encogimiento de la célula con presencia de fraccionamientos citoplasmáticos y la aparición de secciones nucleares que contienen cromatina degenerada. Las fracciones citoplasmáticas, también llamadas cuerpos apoptóticos son rápidamente degradados por la acción de las células fagocíticas del sistema inmune (Stocco, 2007).

La iniciación del proceso apoptótico es mediado por la coordinación de un grupo de genes que se activan, los que codifican para las procaspasas y caspasas (enzimas con una fuerte actividad proteolítica) y por los genes de la familia Bcl-2, mediados por el Calcio (Niswender, 2000), dentro de los que se encuentran Bcl-XL, Bcl-w, Bid, Bax, Bik, Bcl-Xs. Las caspasas están presentes intracelularmente en forma de zimógenos que se encuentran inactivos y deben ser activadas por medio de otra caspasa por otra, por la unión de cofactores y coenzimas que

producen la activación ó por la activación generada por los receptores de muerte celular, de esta forma de desencadena la actividad de un grupo de enzimas que degradan el DNA, conocidas como DNasas; las cuales son endonucleasas que producen una defragmentación internucleosomal del DNA, haciéndolo perder el patrón característico de éste (Flores, 2005).

En el mecanismo de apoptosis también intervienen de manera directa varios factores, entre los que se cuentan las hormonas (gonadotrópicas y esteroidales) y los factores locales ó tróficos; estas sustancias cumplen un papel importante en la regulación de la apoptosis, ya que favorecen la supervivencia celular, actuando como mecanismo anti-apoptótico, que es totalmente dependiente de la expresión de los receptores, para cada uno de éstos en las células. Así mismo el proceso apoptótico es regulado por la expresión de algunos genes de importancia en este proceso.

Los agentes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos, median de manera efectiva en la decisión celular al iniciar ó no este proceso. Al no presentarse una concentración adecuada de receptores de membrana de agentes anti-apoptóticos como tirosinquinasa, hormona de crecimiento, gonadotropinas, proteína G, hormonas esteroideas acopladas a sus receptores nucleares, EGF, EGF, IGF e insulina, acoplados a sus receptores, va a producirse la activación de los genes pro89 apoptóticos (familia Bcl-2); éstos ya activados al interior de la célula van a dirigirse a la mitocondria generando la liberación de agentes pro-apoptóticos, como es el caso del citocromo-C en el citosol celular; el cual va a unirse a la proteasa apoptótica activadora de factor 1 (APAF-1) y a la pro-caspasa 9 formando el complejo proapoptosoma, los que permiten la activación de la pro-caspasa 3 en caspasa 3 (Olivera, 2007).

Una vez ocurrido el proceso de regresión funcional y estructural del cuerpo lúteo, sobre la superficie ovárica, exactamente en donde se encontraba la estructura luteal se forma un cuerpo cicatrizal ó vestigial que también recibe el nombre de cuerpo albicans.

2.3. FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA EN LA HEMBRA RECEPTORA EN UN PROGRAMA DE TE

Existen una serie de causas que afectan la eficiencia reproductiva al aplicar biotecnologías asociadas a la reproducción durante la etapa embrionaria temprana. Actualmente se estima que el porcentaje de pérdidas embrionarias ocurridas antes del día 17 es de aproximadamente entre el 30 y 40% (Araujo, 2005), en condiciones naturales, por eso puede pensarse que al intervenir en estos procesos estas pérdidas pueden ser mayores. Las pérdidas embrionarias deben ser identificadas y diferenciadas de las muertes embrionarias que ocurren después del día 17 de gestación, ya que al ocurrir la pérdida embrionaria, antes del reconocimiento materno, la hembra retornará al estro en la misma fecha que se espera que se presente el próximo estro, en ausencia de la gestación, mientras que las pérdidas embrionarias que se producen después de producirse el reconocimiento materno van a hacer que el estro se presente después del día 25 post-IA. Esto permite pensar que el embrión o parte del trofoblasto estaban vivos el día del reconocimiento de la gestación (Hernández, 2003).

Dentro de las causas de mortalidad embrionaria, también deben tenerse en cuenta factores de tipo genético, los que pueden deberse a la presencia de defectos heredados, alteraciones durante la meiosis celular, problemas durante la fertilización, alteraciones cromosómicas, que se constituyen como causas de pérdida embrionaria, ya que en hembras superovuladas se considera que el 10% de estadios de mórula y blastocistos presentan este tipo de anormalidades citogenéticas, siendo esta una causa directa de pérdida embrionaria.

Existe una serie de moléculas asociadas al proceso de implantación que participan activamente en este proceso. De esta manera cualquier alteración en los procesos de replicación de la información genética va desencadenar falla en la síntesis de proteínas, causando alteraciones en el desarrollo óptimo del embrión y el éxito de la implantación, produciendo una subsecuente pérdida embrionaria en cualquiera de la etapas (Kawarsky, 1996).

La heredabilidad es muy importante en la aparición de algunos desórdenes reproductivos en vacas lecheras. Entre ellos se encuentran la retención placentaria, la presencia de locus anormales, endometritis, anestro y ovarios quísticos. Todos estos factores, al no ser controlados, van a causar alteraciones reproductivas que van a afectar directamente el desempeño reproductivo del animal (Hernández, 2003).

Es importante también tener en cuenta los factores de tipo ambiental, ya que estos van a afectar directamente las condiciones de confort de la hembra bovina afectando así el desempeño de ésta. Es así como el control de la temperatura corporal en el animal, es un proceso integrado, regulado por mecanismos fisiológicos en el hipotálamo; los principales efectos del estrés calórico se observan en la vaca de leche, ya que es poco eficiente en mantener la temperatura corporal debido a que la pérdida de calor depende de la evaporación por vía respiratoria y en menor grado por la sudoración, afectando de manera directa el desempeño productivo y reproductivo de ésta (Ahmad, 1995 y Vasconcelos, 2006). La exposición del animal a temperaturas elevadas induce a que se presente mortalidad embrionaria, ya que experimenta un importante incremento de la temperatura uterina de la hembra gestante, especialmente en zonas tropicales (Ineskeep, 2004 y Tovio, 2010). Los efectos del estrés térmico sobre el embrión joven no son apreciables sino hasta las fases finales de su desarrollo, lo cual se evidencia al someter embriones a temperaturas elevadas, *in vitro*, ya que estos se alteran pero continúan con su desarrollo, produciéndose una pérdida embrionaria posterior durante la etapa de implantación.

Varios factores asociados a la protección del embrión contra el choque calórico pueden ser identificados, los cuales son generados por el zigoto desde que se da el primer clivaje de sus células; por eso es de suma importancia que la hembra brinde al conceptus un ambiente embriotrófico que permita la expresión de genes que codifican para estas moléculas.

Un importante factor que debe ser controlado de una manera efectiva está asociado a la nutrición, ya que existe una influencia directa entre la nutrición y el

desempeño reproductivo del animal. Una nutrición desbalanceada genera un balance energético negativo que trae como consecuencia la disminución del peso del animal y la disminución de los niveles de glucosa sanguínea, necesaria para brindar una fuente energética, que se requiere para llevar a cabo el desarrollo y mantenimiento fisiológico embrionario, y de las funciones reproductivas en la hembra. Este desbalance energético produce una disminución de la función del eje hipotálamo-hipofisiario-ovárico produciendo alteraciones reproductivas, como ovarios sin estructuras que demuestren ciclicidad y anestros prolongados (Palma, 2001). De la misma, manera van a evidenciarse disminuciones en la secreción de GnRH con la subsecuente disminución en la liberación de FSH y LH; además de la inhibición del metabolismo mineralocorticoide por una deficiente liberación de hormona ACTH, inhibición del metabolismo basal, atresia folicular, escasa liberación de TSH, disminución en la tasa de ovulación, celo silente, muerte embrionaria y anestro. Otro factor importante a tener en cuenta son las dietas ricas en proteínas degradables en el rumen, que pueden generar alteraciones en el pH que afectan de manera directa el medio uterino. Se producen alteraciones en los iones; puede afectarse la ionización de los sustratos energéticos para el embrión poniendo en peligro su sobrevivencia antes de producirse el reconocimiento materno de la preñez, lo cual va a producir una pérdida embrionaria temprana.

La toxicidad es uno de los factores que al ser encontrados en el animal van a causar alteración de la funciones reproductivas así como del desarrollo embrionario. Esta toxicidad puede ser desencadenada en el animal por la ingestión de fitoestrógenos, antiestrógenos y algunas sustancias bociógenas que pueden causar alteraciones reproductivas ya que van a alterar los niveles normales de las hormonas que intervienen en la reproducción y por ende se desencadena la muerte embrionaria. La toxicidad también puede ser producida por varias especies de plantas como es el caso de las pertenecientes al género *Astragalus* spp y *Oxytropis* spp (*Conium, Nicotiana, Lupinus*); al ingerir estas plantas se van a producirse malformaciones fetales, modificaciones en el balance de los fluidos fetales, muerte fetal y aborto espontáneo, lo cual se atribuye al contenido de alcaloides pirimidínicos (Hernández, 2003). De la misma forma,

algunas variedades de pino causan alteraciones hormonales y modificaciones en el fluido sanguíneo alterando en determinado caso el ambiente adecuado para desarrollo y sobrevivencia embrionaria.

Los factores del orden infeccioso así como las toxinas generadas por estos microorganismos afectan de manera directa la reproducción de la hembra bovina, ya que estos presentan tropismo por el sistema reproductivo, generando infertilidad. La infección causada por agentes como Leptospira spp, *Campylobacter fetus* y la *Trichomona fetus* pueden causar muerte embrionaria y generar problemas de repetición de servicios en las hembras infectadas. En el caso de infecciones causadas por el *Haemophilus somnus* se producen fallas en la fertilización y mortalidad embrionaria. La acción de agentes patógenos como *Mycoplasma* spp, y *Ureoplasma* spp, también están asociada a desórdenes reproductivos, ya que causan infertilidad en la hembra, incluyendo mortalidad embrionaria. Los hemoparásitos también van a generar un impacto importante en la reproducción de la hembra bovina, ya que al producir su principal efecto (lisis del glóbulo rojo) van a alterar la capacidad para conducir el suficiente volumen de oxígeno a las células, desencadenando abortos y pérdidas embrionarias en las diferentes etapas.

Así mismo, los agentes infecciosos de tipo viral afectan significativamente la viabilidad de los embriones, como es el caso de los virus de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueitis infecciosa y el virus de la lengua azul en los bovinos, los cuales se adhieren a la zona pelúcida, causando múltiples alteraciones reproductivas.

Los factores asociados al control hormonal son importantes para generar condiciones favorables que permitan brindar un ambiente uterino que garantice al embrión un medio uterino adecuado para la supervivencia. El control endocrino para la síntesis de proteínas uterinas durante el desarrollo embrionario temprano ha sido parcialmente aclarado en los bovinos; de esta forma, se reporta que la progesterona es la responsable de los cambios cualitativos y cuantitativos de las proteínas presentes en el medio ambiente uterino controlando la síntesis y secreción de un grupo importante de éstas, desde el punto de vista génico. De

acuerdo a esto se deduce que deficiencias de progesterona pueden causar que el endometrio llegue a ser deficiente en la producción de los nutrientes necesarios para la sobrevivencia.

La progesterona regula la producción de las secreciones uterinas que nutren durante las etapas iniciales al blastocisto, así que cualquier alteración en su composición puede comprometer la supervivencia embrionaria; estas secreciones uterinas transportan substratos energéticos, iones, vitaminas, aminoácidos, péptidos, hormonas, enzimas, entre otras sustancias. Por este motivo cualquier alteración en la composición de la dieta en Ca, Mg, K, proteína total, y glucosa, dan como resultado modificaciones del medio ambiente uterino y esto causa embriones anormales y/o mortalidad embrionaria.

Una vez formada la placenta, brinda un bloqueo para que no sea atacado el embrión, constituyéndose como el medio preferente de protección del individuo en desarrollo. En el caso de la técnica de TE pueden presentarse fallas en los mecanismos de aceptación del embrión generando la muerte embrionaria, ya que las vacas receptoras están recibiendo una carga antigénica adicional, debido a que el embrión es completamente extraño para las hembras receptoras y el sistema inmunológico de la hembra puede desencadenar una respuesta inmune atacándolo y generando una inminente pérdida embrionaria.

Es importante tener en cuenta que existen situaciones causantes de estrés en los animales, ya que éstos son organismos vivos de comportamientos sociales; este estrés puede desencadenar disturbios en el proceso de implantación y en consecuencia causar mortalidad embrionaria.

El período embrionario es la fase más crítica, durante la cual el *conceptus* necesita condiciones óptimas para su sostenimiento, sobre todo cuando realiza la adhesión lenta y gradual a las paredes uterinas. Esta comienza hacia el día 18 de la gestación, cerca al embrión, y el día 36 aún no se ha realizado en toda la extensión del alantocorion. La implantación se completa en toda la extensión mencionada, después del día 70 de la gestación (Hernández, 2008). La

exploración del tracto reproductivo por vía rectal antes de los 60 días de la preñez, puede causar pérdida embrionaria, teniendo en cuenta que la implantación es un proceso lento y gradual, en el que se produce la adhesión del trofoblasto al endometrio y es débil en los estadios tempranos de la implantación.

2.4. MECANISMOS DE CONTROL DEL CICLO ESTRAL EN UN PROGRAMA DE TE: APLICACIÓN DE TERAPIAS HORMONALES

Para poder obtener mejores resultados en cualquier técnica de reproducción asistida debe realizarse un control efectivo del ciclo estral de la hembra bovina.

Actualmente, se vienen desarrollando una serie de protocolos de sincronización del estro, proceso por el cual se controla el ciclo estral de la hembra por medio de la utilización de hormonas exógenas que ejercen un directo control sobre el ciclo.

Estos procedimientos están influenciados principalmente por la acción de la prostaglandina F2α que produce la regresión de una manera precoz del cuerpo lúteo y por la acción de la progestágenos los que actúan en la hembra simulando un cuerpo lúteo (Palma, 2001).

La prostaglandina F2α es uno de los métodos utilizados tradicionalmente en protocolos de control del ciclo estral. El inconveniente de ésta, es que es efectiva únicamente durante la fase luteal del ciclo estral; una aplicación de prostaglandina F2α entre los días 6 y 16 inducirá la regresión de cuerpo lúteo lo que permitirá la finalización de la fase luteal, dando paso al inicio otro ciclo. Al efectuar una aplicación de prostaglandina F2α, se encuentra que solo un 50 y 70% de animales responderán al tratamiento entrando en calor. Si se administran dos aplicaciones de prostaglandina F2α con un intervalo de 11 a 14 días (Gómez, 2005), se permitirá que todas las vacas tengan una fase lútea presente en el momento de la segunda aplicación por lo que se logra la sincronización completa del ciclo estral, realizando la detección del celo 5 días después de la segunda aplicación. Sin embargo la acción de prostaglandina F2α se ve limitada por que solo actúa en

animales que se encuentren ciclando y que presenten un cuerpo lúteo normal (Hafez, 2000; Bó, 2002 y Gouveira, 2004).

Otra manera para Sincronizar el ciclo estral de la hembra bovina es con la ayuda de la progestágenos, por medio de la cual se trata de simular la fase luteínica del ciclo estral, prolongándola (Gordon, 1999). El beneficio de este sistema de control del ciclo estral, es que no se necesita que el animal presente un cuerpo lúteo funcional. Al encontrarse niveles de progesterona exógena en el sistema del animal va a generarse un bloqueo hormonal, debido a que éste simula la presencia de un cuerpo lúteo; pero es importante contar con un sistema en el que los niveles de progesterona permanezcan por un espacio de tiempo determinado en el cuerpo del animal, como pueden ser implantes subcutáneos, dispositivos intravaginales, esponjas, entre otros.

Las nuevas aplicaciones de tratamientos hormonales muestran que la interacción de hormonas generan mejores resultados en el control del ciclo estral (sincronización de celos). Así se encuentra que existen varios protocolos como el Ovsynch en el que se aplica GnRH + prostaglandina F2α + GnRH para después de 16 a 24 horas post-aplicación de la segunda dosis de GnRH proceder a Inseminar a tiempo fijo.

Para la aplicación de las técnicas de sincronización del estro también se encuentran protocolos en los que se emplean dispositivos de liberación lenta de progesterona. Esta hormona ha sido empleada hace aproximadamente cuarenta años para el control del ciclo estral (Wiltbank, 1965). Actualmente se está trabajando con estos dispositivos que al utilizarlos en el animal por vía intravaginal, al día cero del protocolo sumado con la aplicación de Benzoato de

Estradiol, va a producir un control del desarrollo folicular, ya que al aumentarse los niveles de estradiol se estimula la secreción de inhibina, pero genera un déficit de los niveles de folistatina, lo cual genera una disminución de la acción de FSH (Bó, 2002).

El dispositivo de liberación lenta de progesterona al ser utilizado solo, genera unos niveles muy bajos de ésta y al estar presente estos niveles en el cuerpo del animal se va a producir una sobremaduración por la persistencia del folículo lo cual hace que cuando ovule este folículo se obtenga un oocito alterado o envejecido (Sánchez, 1995 y Sartori, 2002). Al aplicar el dispositivo de liberación de progesterona junto con una dosis de estradiol se genera una retroalimentación negativa para la liberación de GnRH actuando hipotálamo y suprimiendo el desarrollo de los folículos presentes en el ovario, como la vida media del estradiol exógeno es de aproximadamente 4 días, el día 4.3 caen los niveles de éste haciendo que se produzca una liberación de GnRH en el hipotálamo, la cual va a la hipófisis liberando FSH y LH, permitiendo que se inicie una nueva onda de crecimiento folicular (Bó, et al, 2002). De esta manera combinando la regulación de la fase folicular con la de la fase luteal, es posible predecir el surgimiento de una nueva onda de desarrollo folicular. El día 7 contado desde el inicio del protocolo de sincronización se retira el dispositivo y se realiza una aplicación de prostaglandina F2α (para inducir luteolisis); el día 8 se aplica Benzoato de Estradiol (para sincronizar el momento de la ovulación) y treinta horas después proceder a Inseminar a tiempo fijo (Barreto, 2002), ya que la mayoría de los animales ovúlan 66 horas después de retirado el implante de liberación lenta de progesterona (Acosta, 2004). La variabilidad de resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas de sincronización hace que se permita avanzar en los protocolos que controlan el desarrollo folicular; de manera que los animales presenten un folículo en crecimiento, con capacidad de ovular en el momento del retiro del dispositivo de liberación lenta de progesterona y de la aplicación de la prostaglandina (Bó, 1991; Kastelic, 1996 y Colazo, 1996).

Adicionalmente a los anteriores protocolos utilizados para el control del ciclo estral en las hembras receptoras de embriones para la técnica de TE, se están empleando en estos protocolos el uso de hormonas para favorece el desarrollo folicular, así como la luteinización que ocurre una vez producida la ovulación; por este motivo se ha vinculado el uso de hormonas como la Gonadotropina Coriónica equina (eCG) en pro del incremento de la eficiencia tras la aplicación de la TE. La

anterior hormona es aplicada buscando favorecer el crecimiento folicular durante el ciclo sincronizado (Baruselli, 2005), así como el proceso de especialización de las células foliculares durante la luteinización una vez producida la ovulación (Helmer, 1986). Lo anterior va a influenciar la formación y consolidación de un cuerpo lúteo funcional, que genere unas concentraciones plasmáticas de progesterona que permitan el establecimiento de un medio uterino favorable para el desarrollo, implantación embrionaria y mantenimiento de la gestación

La gonadotropina coriónica equina es una hormona glicoproteína, sintetizada y liberada los cálices endometriales en la hembra equina gestante entre los días 40 a 130 (Bousfield, 2001). Esta sustancia presenta tropismo por los receptores foliculares de las hormonas foliculoestimulante y luteinizante, presentes en el folículo; así como por los receptores en las células del cuerpo lúteo para la hormona luteinizante; de esta manera se va a favorecer el incremento en la síntesis de RNA mensajero que codifica para receptores de hormonas gonadotrópicas en estas células, permitiendo el aumento de la densidad de este tipo de receptores; lo anterior está asociado a los fenómenos de dominancia folicular, preparación para la ovulación y especialización celular para el desarrollo del cuerpo lúteo (Baruselli, 2003).

Con la aplicación de la gonadotropina coriónica equina durante el día cinco, se busca favorecer el desarrollo folicular, ya que esta hormona al interviene en la síntesis de mRNA que codifica para los receptores de hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) a nivel folicular, permitiendo que el folículo dominante mantenga su desarrollo. Adicionalmente a nivel de las células foliculares se produce el aumento en la síntesis para la expresión de receptores de hormona luteinizante, mediante este mecanismo se inicia el proceso de dominancia folicular, la cual es influenciada por la acción de las hormonas LH y FSH.

Las ventajas de hacer una sincronización del ciclo estral por medio de ayudas hormonales en la hembra bovina son: favorecer la presentación de celo en las vacas lactantes que no se han visto en celo a los 45 días postparto, la reducción del tiempo necesario para la detección del celo, facilitar el empleo de la

inseminación artificial en las empresas ganaderas, aumentando la efectividad en programas de transferencia de embriones y otras biotecnologías, ayudar a las hembras que están en estado de anestro lactacional, entre otros (Cutaia, 2001).

2.5. USO DE LA ULTRASONOGRAFÍA COMO HERRAMIENTA EN EL TÉCNICA DE TE

Es importante hacer un control de las diferentes etapas durante la sincronización y superovulación de las hembras donantes así como de las receptoras en un programa de TE, ya que de esta forma se puede controlar de manera efectiva el tamaño y morfología de cada una de la estructuras que se encuentran en el ovario durante las diferentes etapas de esta técnica. Los métodos de diagnóstico utilizados en la práctica veterinaria han aportado el uso de la ultrasonografía para el diagnóstico de gestación en diferentes especies, pero es con el uso de esta herramienta que se ha facilitado el estudio de los fenómenos fisiológicos en la reproducción de una manera poco invasiva, en particular para la compresión de la dinámica folicular y los cambios presentes en el ovario durante el ciclo de la hembra bovina (Adams, 1992). Gracias a este tipo de avances hay una mejor comprensión de los mecanismos de control de las ondas foliculares lo que ha permitido desarrollar y mejorar los protocolos de control del ciclo estral y multiovulación, para poder dar un enfoque con mayor productividad y eficiencia a la reproducción asistida en grandes animales (Burke, 1996 y Pursley, 1997).

También se han desarrollado otras aplicaciones como sexaje fetal, seguimiento de las estructuras ováricas, folículocentesis para aspiración de los folículos, diagnóstico de anormalidades reproductivas, monitoreo durante el tratamiento de ovarios quísticos, seguimiento de la involución uterina post-parto, evaluación del desarrollo fetal durante las fases de gestación, entre otras aplicaciones (Ribadu, 1994; Jeffcoate, 1995 y Edmondson, 1986).

La ultrasonografía permite observar los folículos antrales como estructuras ecogénicas que presentan en su interior un acúmulo de líquido; al presentarse la ovulación y formación de cuerpo lúteo por medio de la ultrasonografía puede

observarse en el ovario una estructura redondeada la cual en algunos casos se puede evidenciar un área no ecogénica central. Esto indica la presencia de un cuerpo lúteo cavitario que tiene una menor capacidad de secretar progesterona ya que su área es menor que uno del mismo tamaño que no presente esta cavidad (Kastelic, 1990).

Antes de cada proceso asociado a la técnica de TE debe hacerse un chequeo ultasonográfico de las hembras bovinas (Ribadu, 1999), ya que además de todos los criterios de selección para las hembras receptoras, también debe tenerse muy en cuenta los fenómenos fisiológicos presentes en sus ovarios. Así con la ayuda de la ultrasonografía trans-rectal se permite determinar cómo afecta una estructura como el folículo preovulatorio de una manera directa al subsecuente tamaño que pueda presentar el cuerpo lúteo ya que al presentarse un folículo preovulatorio pequeño puede generar la formación de un cuerpo lúteo pequeño; mientras que un folículo preovulatorio grande, va a dar paso a un cuerpo lúteo de mayor tamaño y por ende unos niveles de progesterona mayores que generen unas condiciones uterinas favorables para el desarrollo del embrión que ha sido transplantado. Por eso es importante determinar el tamaño de las estructuras ováricas antes de realizar la trasferencia del embrión a la hembra receptora con la ayuda de técnicas ultrasonográficas (Vasconcelos, 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Materiales de Campo

- Nueve hembras bovinas criollas
- Cabos
- Brete
- Jeringas
- Guantes ginecológicos
- Gel para ecógrafo
- Ecógrafo
- Cámara fotográfica
- LH (Choluron, Intervet®)
- Benzoato de estradiol (Syntex®)
- DIB 0,5 (Implante progesterona, Syntex®)
- Aplicador DIB (Syntex®)
- PGF2α (Lutaprost 250, Agrovetmarket®)
- eCG (Novormon, Syntex®)
- GnRH (Fertagyl, Intervet®)
- Progesterona (Erma®)
- Registros

3.1.2. Materiales de Oficina

- Computadora

- Hojas
- Lápiz
- Impresora
- Cuaderno
- Calculadora
- Flash memory.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Ubicación del Ensayo

La presente investigación se llevó a cabo en las parroquias Purunuma y Nambacola, pertenecientes al Cantón Gonzanamá. El cantón Gonzanamá se encuentra ubicado, a 83 Km. de la ciudad de Loja, y cuenta con las siguientes características climatológicas.

- Altitud a 2300 msnm
- Temperatura promedio 16 °C
- Precipitación anual 750 mm/año
- Humedad relativa 75 %
- Formación ecológica bosque seco Montano Bajo (bs – MB).

3.2.2. Selección de las Receptoras

Para seleccionar a las hembras bovinas se tomó en cuenta los siguientes criterios técnicos:

- Que se encuentren reproductivamente sanas
- Que se encuentren vacías y con un mínimo de 60 días postparto.

- Que se encuentren con una condición corporal entre 2.0 a 3.0 (escala 1 a 5 puntos)
- Que reúna las características fenotípicas del ganado criollo.
- Si es una vacona que la misma tenga dos años de edad y este ciclando
- Si es una vaca adulta que la misma este máximo de 5 partos.

3.2.3. Unidad Experimental (UE)

Se consideró como unidad experimental (UE) en la presente investigación a una hembra bovina de la raza criolla que reúna las características antes señaladas, cada una de ellas fue identificada con el tratamiento y repetición correspondiente, mediante el número de arete que poseían las UE.

3.2.4. Tamaño del Experimento y Manejo de las UE

Se utilizaron nueve UE, divididas en tres tratamientos, las cuales fueron sometidas a un protocolo de sincronización de celo para receptoras y las mismas, 20 días previo al proceso biotecnológico fueron desparasitadas, vitaminizadas, aplicadas por vía parenteral un reconstituyente a base de fosforo y se les administró diariamente sales minerales.

3.2.5. Descripción de los Tratamientos

Cada tratamiento fue constituido de tres UE asignadas aleatoriamente, a las cuales se les aplicaron el siguiente protocolo:

Cuadro 1. Tratamientos aplicados en sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas.

DÍA	T1 (GNRH)	T2 (LH)	T3 (TESTIGO)
0	DIB + 2mg BE +50 mg P4	DIB + 2mg BE +50 mg P4	DIB + 2mg BE +50 mg P4
7	400 UI eCG	400 UI eCG	400 UI eCG
8	Retiro DIB + 2 cm PGF2α	Retiro DIB + 2 cm PGF2α	Retiro DIB + 2 cm PGF2α
9	1 mg BE	1 mg BE	1 mg BE
10	GNRH	LH	
16	Evaluación del CL por ecografía	Evaluación del CL por ecografía	Evaluación del CL por ecografía

3.2.6. Diseño Experimental

Se utilizó un diseño de bloques al azar, con tres tratamientos y repeticiones o bloques, donde cada unidad experimental se constituyó en una repetición o bloque.

3.2.7. Variables en Estudio

1. Tamaño de ovarios al inicio del tratamiento
2. Tiempo de presentación del celo manifiesto pos retiro DIB
3. Duración e intensidad del celo manifiesto
4. Porcentaje de animales que presentaron celo manifiesto
5. Sintomatología del celo manifiesto
6. Tamaño del folículo
7. Tamaño del cuerpo lúteo al día siete post celo.

3.2.8. Toma y Registro de Datos

a) Tamaño de ovarios al inicio del tratamiento

El tamaño de los ovarios se determinó por medio de ecografía, considerando la longitud mayor de los mismos.

b) Tiempo de presentación del celo manifiesto post retiro DIB

Se evaluó el tiempo en horas en que se presentó el celo luego del retiro del DIB considerando la diferencia entre la fecha y hora de retiro del DIB frente a la fecha y hora de presentación de celo, los datos se registraron en el anexo 2. El inicio del celo se determinó cuando el animal estuvo inquieto y se dejó montar de otros bovinos.

c) Duración e intensidad del celo manifiesto

La duración del celo se determinó tomando en cuenta la hora de inicio del celo y la hora de finalización donde se aplicó la siguiente fórmula:

Duración del celo = Hora de finalización del celo – Hora de inicio

Se consideró como finalizado el celo en un animal, cuando el mismo rehúye a la monta de otros animales y está más tranquilo y se dedica únicamente a pastar.

La intensidad del celo manifiesto se determinó de la siguiente manera:

Muy Bueno: Cuando la UE presente todos los síntomas característicos del celo como son vulva hinchada, presencia de moco, inquietud, monta y se deja montar, baja la producción de leche, disminución del apetito entre otros síntomas, además el tiempo de presentación del celo es prolongado.

Bueno: Cuando la UE presente los síntomas característicos del celo siendo estos en menor intensidad y sin la presencia de todos los síntomas del celo.

Regular: Los síntomas no son muy expresivos

Baja: Cuando la presencia del celo es pasajera

Estos datos se los registró en el anexo 2.

d) Porcentaje de animales que presentaron celo manifiesto

Se evaluó el porcentaje de animales que presentaron celo manifiesto luego de aplicado el tratamiento con la siguiente fórmula:

% animales en celo = (Animales que presentaron celo manifiesto/ Total UE) x 100.

e) Sintomatología del celo manifiesto

Se registró toda la sintomatología de las UE que hayan presentado celo manifiesto como son:

- ✓ Vulva edematizada

- ✓ Presencia de moco
- ✓ Inquietud
- ✓ Monta y se deja montar
- ✓ Baja la producción de leche
- ✓ Otros

f) Tamaño del folículo

El tamaño del folículo se consideró el largo mayor del folículo y el mismo fue medido por ecografía el día del celo y se registró los datos en el anexo 3.

g) Tamaño del cuerpo lúteo al día siete post celo

El tamaño del cuerpo lúteo, también se consideró la longitud mayor del mismo y se evaluó por ecografía el día siete post celo, se registró los datos en el anexo 3.

3.2.9. Análisis Estadístico

Se utilizó un ADEVA para cada una de las variables analizadas y si existió diferencia estadística (P>0.05), se realizó la prueba de Duncan para la comparación entre los tratamientos.

a. Hipótesis estadística.

$Ho = \bar{Y}1 = \bar{Y}2 = \bar{Y}3$

$Hi = \bar{Y}1 \neq \bar{Y}2 \neq \bar{Y}3$

b. Modelo matemático

$Yij = u + Ti + Bj + eij$

En donde

i = t (número de tratamientos)

j = r (número de repeticiones

c. Términos de corrección

$$TC = \frac{(\sum_{ij} Y_{ij})^2}{r.t}$$

d. Suma de cuadrados total

$$SCT = \sum_{ij} Y^2_{ij} - TC$$

e. Suma de cuadrados de bloques

$$SCb = \frac{\sum_j Y^2_j}{t} - TC$$

F

f. Suma de cuadrados de tratamientos

$$SCt = \frac{\sum_j Y^2_j}{r} - TC$$

g. Suma de cuadrados del error

$$Sce = SCT - SCb - SCt$$

4. RESULTADOS

4.1. TAMAÑO DE OVARIOS AL INICIO DEL TRATAMIENTO

El tamaño de ovarios al inicio del tratamiento se lo determinó mediante ecografía y para ello se consideró el ovario funcional o si ambos ovarios de dicha UE no tenían estructuras, se tomó el de mayor longitud.

Cuadro 2. Promedio del tamaño de ovarios (mm) al inicio de los protocolos de sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas.

Bloques	Tratamientos		
	T1 (GNRH)	T2 (LH)	T3 (TESTIGO)
1	25,3	18	23
2	27,5	20	15
3	32,2	25	17
Promedio (mm)	**28,3**	**21,0**	**18,3**

El tratamiento uno (GNRH) presentó un promedio de 28,3 mm; el tratamiento dos (LH) de 21 mm y el tratamiento tres (TESTIGO) el tamaño del ovario funcional fue de 18,3 mm. Realizado el análisis estadístico (P>0.05), se determinó que en el tamaño de los ovarios no hubo diferencia y por tanto esta variable no influyó en los resultados obtenidos con el resto de variables en los tratamientos.

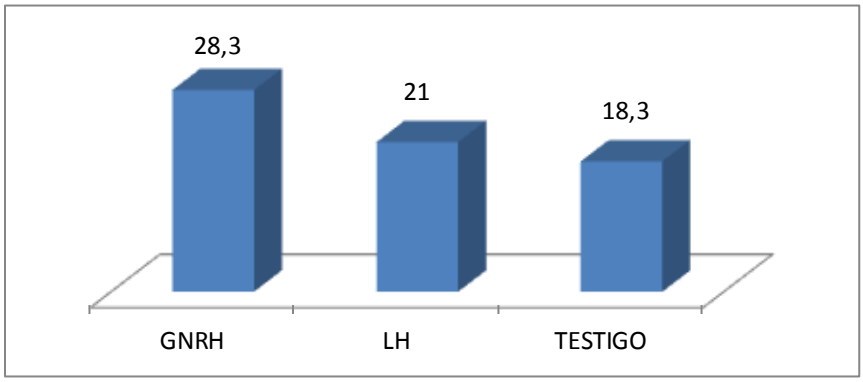


Figura 4. Promedio del tamaño de los ovarios al inicio de los diferentes tratamientos de sincronización aplicados en vacas criollas (mm).

Figura 5. Medición del tamaño de ovarios e inicio del tratamiento hormonal

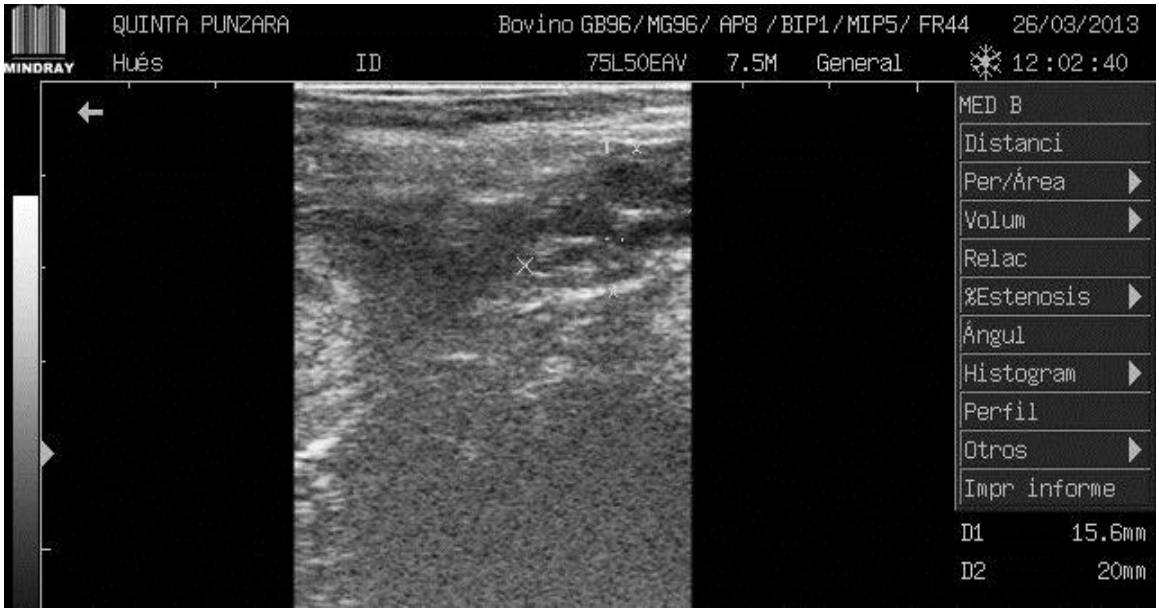


Figura 6. Ecografía para determinar el tamaño de ovario.

4.2. TIEMPO DE PRESENTACIÓN DEL CELO MANIFIESTO POST RETIRO DIB

El tiempo de presentación del celo manifiesto post retiro DIB se determinó considerando la diferencia entre la fecha y hora de retiro del DIB frente a la fecha y hora de presentación de celo.

Cuadro 3. Promedio del tiempo de presentación del celo manifiesto post retiro DIB en los protocolos de sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas (horas).

Bloques	Tratamientos		
	T1 (GNRH)	**T2 (LH)**	**T3 (TESTIGO)**
1	24,5	26	21
2	45,83	23,5	26,33
3	21	41,83	41,5
Promedio (Horas)	**30,4**	**30,4**	**29,6**

El tratamiento uno (GNRH) y el tratamiento dos (LH) presentaron un tiempo promedio de presentación del celo manifiesto post retiro DIB de 30,4 horas, mientras que el tratamiento tres (TESTIGO) presentó un tiempo promedio de 29,6 horas.

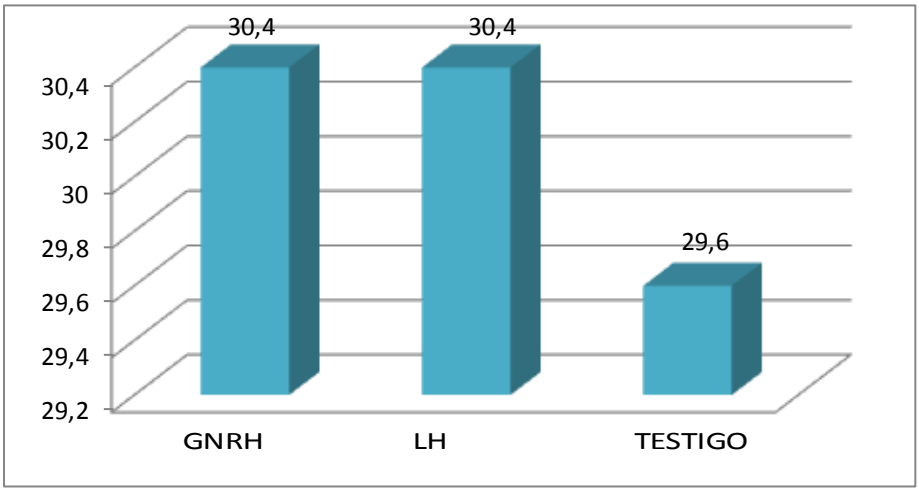


Figura 7. Tiempo de presentación del celo manifiesto post retiro DIB en los tratamientos de sincronización aplicados a vacas criollas (horas).

El análisis estadístico (P>0.05), determinó que no hay diferencia estadística entre los tres tratamientos en cuanto al tiempo de presentación del celo manifiesto post retiro del DIB.

4.3. DURACIÓN E INTENSIDAD DEL CELO MANIFIESTO

La duración del celo se determinó tomando en cuenta la hora de inicio del celo, cuya sintomatología inicial fue vulva edematizada e inquietud y la hora de finalización que fue cuando el animal rehúye a la monta de otros animales y está más tranquilo y se dedica únicamente a pastar.

Cuadro 4. Promedio de la duración e intensidad de celo manifiesto en los tratamientos de sincronización de celo aplicados a vacas criollas (horas y porcentaje).

Bloques	**Tratamientos**		
	T1 (GNRH)	**T2 (LH)**	**T3 (TESTIGO)**
1	25	24	18
2	24	33	15
3	30	5	16
Promedio (Horas)	**26,3**	**20,7**	**16,3**
Porcentaje	**100 % MB**	**67 % MB**	**67 % MB**
		33 % R	**33 % B**

El tratamiento uno (GNRH) presentó un tiempo de duración del celo de 26,3 horas; el tratamiento dos (LH) de 20,7 horas y el tratamiento tres (TESTIGO) tuvo una duración de celo manifiesto de 16,3 horas.

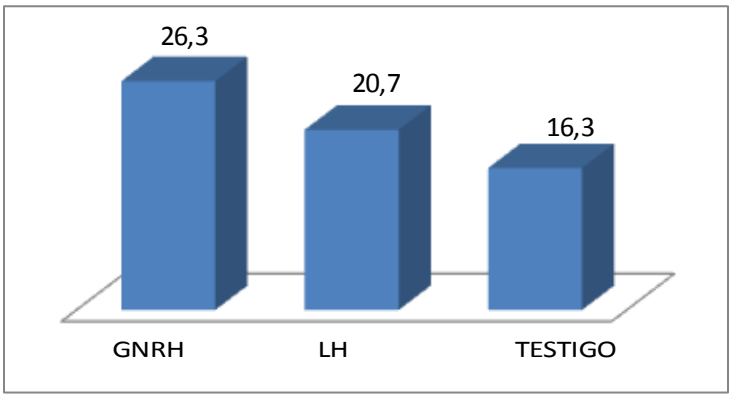


Figura 8. Tiempo de duración del celo manifiesto en los tratamientos de sincronización aplicados a vacas criollas (horas).

El análisis estadístico (P>0.05) determinó que no hay diferencia estadística entre los tres tratamientos en cuanto a la duración del celo manifiesto, matemáticamente, se observa una marcada diferencia entre los grupos, pero al análisis estadístico no se diferencia debido a la gran variabilidad dentro de los grupos.

En lo que tiene que ver a la variable *Intensidad del Celo Manifiesto*, fue calificada de la siguiente manera:

Muy Bueno: Cuando la UE presentó todos los síntomas característicos del celo como son vulva edematizada, presencia de moco, inquietud, monta y se deja montar, baja la producción de leche, disminución del apetito entre otros síntomas, además el tiempo de presentación del celo es prolongado.

Bueno: Cuando la UE presentó los síntomas característicos del celo siendo éstos en menor intensidad y sin la presencia de todos los síntomas del celo.

Regular: Los síntomas no fueron muy expresivos

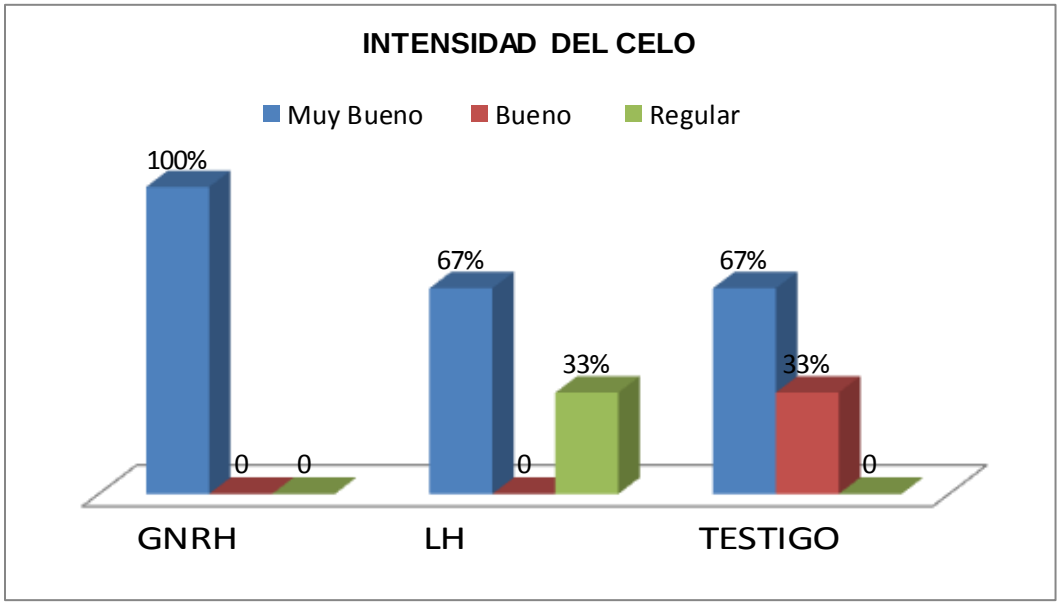


Figura 9. Intensidad del celo manifiesto en los tratamientos de sincronización aplicados a vacas criollas.

El tratamiento uno (GNRH) presentó una intensidad de celo muy bueno en el 100% de las UE; el tratamiento dos (LH) el 67% de las UE presentó un celo muy bueno y el 33% presentaron un celo regular y el tratamiento tres (TESTIGO) el 67% de las UE presentó un celo muy bueno mientras que el 33% restante presentó un celo bueno.

4.4. PORCENTAJE DE ANIMALES QUE PRESENTARON CELO MANIFIESTO

El porcentaje de animales que presentaron celo manifiesto se determinó con la siguiente formula:

% animales en celo = (Animales que presentaron celo manifiesto/ Total UE) x 100.

Cuadro 5. Porcentaje de animales que presentaron celo manifiesto en los protocolos de sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas.

Bloques	**Tratamientos**		
	T1 (GNRH)	**T2 (LH)**	**T3 (TESTIGO)**
1	100	100	100
2	100	100	100
3	100	100	100
Porcentaje (%)	**100**	**100**	**100**

En los tres tratamientos de sincronización de celo para receptoras que se analizaron, hubo una excelente respuesta en todas las UE, presentando celo manifiesto en el 100% de los tratamientos.

4.5. SINTOMATOLOGÍA DEL CELO MANIFIESTO

Para la calificación de esta variable, se tomó en consideración la presencia de 5 síntomas principales, para ser considerada una hembra que está en el 100% con la sintomatología de celo, estos fueron: vulva edematizada, presencia de moco, inquietud, monta y se deja montar, baja la producción de leche.

Cuadro 6. Porcentaje de sintomatología de celo manifiesto en los protocolos de sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas

Bloques	Tratamientos		
	T1 (GNRH)	T2 (LH)	T3 (TESTIGO)
1	100	100	100
2	100	100	80
3	100	40	100
Porcentaje (%)	**100**	**80**	**93,33**

En el tratamiento uno (GNRH) el 100% de las UE presentaron toda la sintomatología de celo manifiesto, a más de todos estos síntomas registrados, cabe anotar que presentaron disminución del apetito; en tanto que en el tratamiento dos (LH) todas las UE presentaron síntomas de celo manifiesto, pero una de ellas no presentó tres síntomas principales, teniendo por tanto un 80% de respuesta sintomatológica; en tanto que la respuesta de esta variable en el tratamiento tres (TESTIGO) fue que todas las unidades experimentales presentaron sintomatología de celo manifiesto excepto una que no presentó uno de los síntomas principales, presentando por tanto un 93.3% de respuesta sintomatológica.

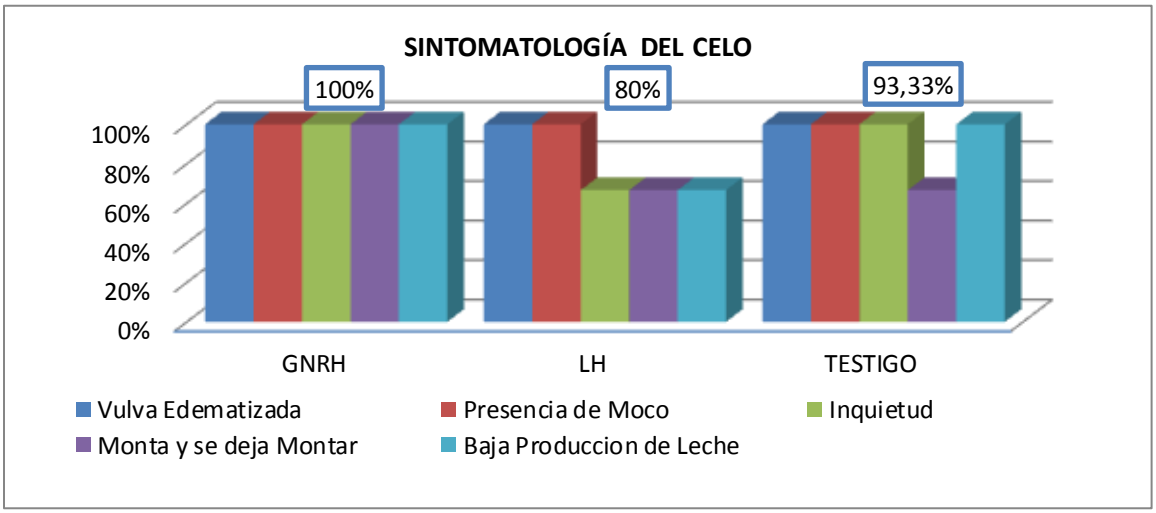


Figura 10. Porcentaje de UE que presentaron sintomatología de celo manifiesto por síntoma y por tratamiento aplicados en vacas criollas.

4.6. TAMAÑO DEL FOLÍCULO PREOVULATORIO

Para medir el tamaño del folículo se consideró la longitud mayor del folículo midiéndolo por ecografía el día del celo.

Cuadro 7. Promedio de tamaño de folículo (mm) en los protocolos de sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas.

Bloques	Tratamientos		
	T1 (GNRH)	T2 (LH)	T3 (TESTIGO)
1	16,5	11,5	16
2	11,9	13,6	7,8
3	14,1	9,8	11,1
Promedio (mm)	**14,2**	**11,6**	**11,6**

El tratamiento uno (GNRH) presentó un promedio de 14,2 milímetros; el tratamiento dos (LH) y tres (TESTIGO) presentaron un promedio igual de 11,6 milímetros.

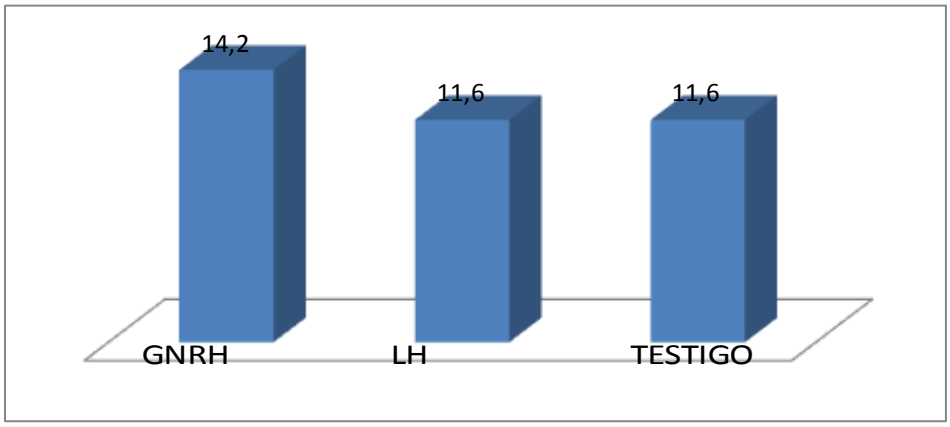


Figura 11. Tamaño del folículo prevulatorio en los diferentes tratamientos de sincronización aplicados en vacas criollas (mm).

El análisis estadístico (P>0,05) determinó que no hay diferencia estadística en los resultados obtenidos entre los tratamientos en cuanto al tamaño del folículo preovulatorio.

4.7. TAMAÑO DEL CUERPO LÚTEO AL DÍA SIETE POST CELO

Para medir el tamaño del cuerpo lúteo se utilizó ecografía considerando la longitud mayor del mismo.

Cuadro 8. Promedio del tamaño del cuerpo lúteo al día siete post celo (mm) en los protocolos de sincronización de celo evaluados en vacas receptoras criollas

Bloques	Tratamientos		
	T1 (GNRH)	T2 (LH)	T3 (TESTIGO)
1	20	19,5	15
2	22	23,6	20,3
3	18	18,4	15,9
Promedio (mm)	**20,0**	**20,5**	**17,1**

El tratamiento uno (GNRH) presentó un promedio de 20 mm de tamaño de cuerpo lúteo; en tanto que el tratamiento dos (LH) presentó un promedio de CL de 20,5 mm y el tratamiento tres (TESTIGO) el tamaño promedio fue de 17,1 mm.

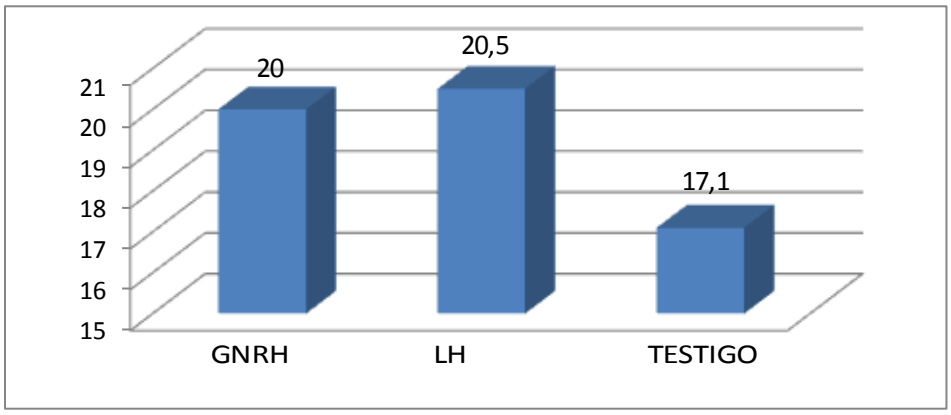


Figura 12. Promedio del tamaño del cuerpo lúteo al día siete post celo en los tratamientos aplicados a vacas criollas.

El análisis estadístico (P<0,05) determinó que no hay diferencia en los resultados obtenidos entre los tratamientos uno (GNRH) y dos (LH); pero si hubo diferencia estadística significativa con el tratamiento tres (TESTIGO). Demostrando que los tratamientos uno (GNRH) y dos (LH) son mejores con respecto al tratamiento tres (TESTIGO).

5. DISCUSIÓN

5.1. TAMAÑO DE OVARIOS AL INICIO DEL TRATAMIENTO

El presente trabajo de investigación fue realizado en vacas criollas manejadas al pastoreo extensivo en la sierra medio alta de los Andes en la Región Sur del Ecuador, al respecto se debe manifestar que no se tiene ninguna información técnica que se haya realizado con este tipo de animales, por lo que los mismos representan una referencia para futuros trabajos a realizar dentro del campo de las biotecnologías reproductivas, sea con fines de mejora genética y/o de conservación.

Respecto al tamaño de ovarios al inicio de tratamiento en vacas criollas receptoras, se obtuvo un promedio de tamaño en los tres tratamientos de 22,5 mm; cabe manifestar que se tiene poca información de resultados obtenidos en otros trabajos de investigación con bovinos criollos. Comparando este resultado con el trabajo realizado por Gómez, et al. (2006), en donde midió el diámetro mayor de los ovarios en vacas de cruza holstein x cebú, clasificando en pequeños (10-24 mm) medianos (25-35 mm) y grandes (36-55 mm), considerando por tanto que nuestros animales criollos tienen ovarios pequeños de acuerdo al criterio de estos investigadores, lo cual se correlaciona dada la estatura pequeña que tienen los bovinos criollos de la RSE (Aguirre, et al. 2011).

5.2. TIEMPO DE PRESENTACIÓN DEL CELO MANIFIESTO POS RETIRO DIB

Respecto al tiempo de presentación del celo manifiesto pos retiro DIB se obtuvo un promedio en los tres tratamientos de 30,1 horas; teniendo que el tratamiento uno (GNRH) y el tratamiento dos (LH) presentaron un tiempo promedio de presentación del celo manifiesto por retiro DIB de 30,4 hs, mientras que el tratamiento tres (TESTIGO) presento un tiempo promedio de 29,6 hs. Gutierrez (2001) en un trabajo realizado en vacas doble propósito encontró una media de presentación de celo post retiro del DIB de 30.4 horas.

Según Fernández y Acosta (1996) encontraron que el mayor número de animales entran en celo entre las 25 y 48 horas después de retirado el implante, mientras que en el trabajo reportado por Mora y Pérez (1998), encontraron que el mayor número de animales entraron en celo en una media de 28 horas; estos valores se encuentran dentro o muy cerca de los obtenidos en la presente investigación.

5.3. DURACIÓN E INTENSIDAD DEL CELO MANIFIESTO

Respecto a la duración e intensidad del celo manifiesto se obtuvo un promedio de tiempo de duración del celo manifiesto de 21,1 horas; teniendo que el tratamiento uno (GNRH) presentó un tiempo de duración de 26,3 horas y con un 100% de las UE que presentaron una intensidad de celo manifiesto muy bueno; el tratamiento dos (LH) con 20,7 horas y con una intensidad de celo manifiesto del 67% muy bueno y un 33% regular y el tratamiento tres (TESTIGO) con una duración de 16,3 horas y una intensidad de celo manifiesto de 67% muy bueno y un 33% bueno; estos resultados están dentro de los señalados por González (2006), que la duración del celo es de 6 a 30 horas, dependiendo esto del tamaño del folículo maduro, el que está bajo la influencia de la FSH y de la secreción de estrógenos. También vale señalar que Gutiérrez (2001), utilizando el DIB en vacas doble propósito, el celo tuvo una duración de 14.3 horas.

Nascer et al, (2004) han verificado que con la aplicación de 400 UI eCG en vacas holstein al día 8 de sincronización, los animales presentaron una intensidad de celo excelente teniendo en cuenta que esta hormona tiene efecto FSH y LH y es de larga duración, por tanto se corrobora con los resultados obtenidos en nuestras vacas criollas que en las condiciones de manejo al pastoreo extensivo en el medio se obtuvo una respuesta en duración e intensidad de celo como muy buena del 78%.

5.4. SINTOMATOLOGÍA DE CELO MANIFIESTO

En los tres tratamientos todas las UE presentaron celo manifiesto dando un 100% en todos los tratamientos; respecto a la sintomatología del celo manifiesto el

tratamiento uno (GNRH) presentó el 100% de toda la sintomatología de celo; el tratamiento dos (LH) todas las UE presentaron síntomas de celo manifiesto, pero una de ellas no presentó toda la sintomatología, dando un 80% de sintomatología presentada; en el tratamiento tres (TESTIGO) todas las unidades experimentales presentaron sintomatología de celo manifiesto, pero una unidad experimental no presento toda la sintomatología teniendo 93.33% de la sintomatología presentada en este tratamiento.

El tratamiento que presentó mejor sintomatología del celo manifiesto fue el tratamiento uno (GNRH) con un 100% de toda la sintomatología presentada además presentaron disminución del apetito.

Llivicura (2012) al evaluar la presentación de celos en ganado Charoláis que se sometieron al proceso de sincronización para la transferencia de embriones tratadas con eCG, el 100% de estas presentaron celos, por lo que se puede mencionar que estos son mecanismos idóneos para el medio y que incentivan a promover con éxito el proceso reproductivo en las hembras bovinas.

Sadbay, (2005) utilizando 400 UI de eCG al día 8 del tratamiento de sincronización obtuvo un 97% de presentación de celo manifiesto.

Según Carua, P. (2008), utilizando 400 UI de eGG, al día 7 evaluando el comportamiento de lotes de vaconas vientres Holstein (mestizas y puras) en la recepción de óvulos fecundados, determino del 95 al 100% de celos en vaconas, valores similares a los obtenidos en los tres tratamientos de sincronización en receptoras criollas.

5.5. TAMAÑO DEL FOLÍCULO PREOVULATORIO

Respecto al tamaño del folículo el tratamiento uno (GNRH) presentó un promedio de 14,2 milímetros; el tratamiento dos (LH) y tres (TESTIGO) presentaron un promedio igual de 11,6 milímetros.

Según Senger (2003), y Sartori (2004) los valores propuestos para folículos preovulatorios en protocolos de sincronización para receptoras deben de ser de ≥10 mm, teniendo en cuenta que en el presente trabajo de investigación se obtuvo diámetros foliculares de 11,6 mm y 14,2 mm; así mismo Lynch (2010), en un grupo de novillas (Bos taurus), con características cárnicas, al aplicar terapia para el control del ciclo estral, observo que la totalidad de los animales presento desarrollo folicular ≥10 mm; estos hallazgos son similares a lo observado por Sartori (2002) y Perry (2005), los cuales observaron desarrollo folicular en diferentes grupos de vacas y novillas, a las que se sincronizo el estro por medio de terapia hormonal, en animales raza Holstein y cruzados con características cárnicas, respectivamente.

Así mismo es de destacar el tamaño del foliculo preovulatorio obtenido por Filho et al., (2010), que utilizando dos tratamientos de sincronización para IATF en vacas de raza Nelore, en donde incluyeron eCG en un grupo y eCG más GnRH en otro (aplicadas el día 9 con respecto al día de inicio del protocolo de sincronización), obtuvieron un promedio de diámetro para el folículo dominante de 8.2 ± 0.9 mm, (grupo eCG), y 8.5 ± 0.8 mm (grupo eCG + GnRH).

Machado et al., (2006), compararon tres protocolos de aplicación eCG en diferentes dosis al día 9 para el control del ciclo estral, reportando los siguientes diámetros foliculares de 9.5±0.6 mm. (Protocolo 1; 200 UI de eCG), 9.6±1.7 mm. (Protocolo 2; 300 UI de eCG) y 9.8±0.6 mm. (Protocolo 3; 400 UI de eCG) en hembras cruzadas (Bos taurus x Bos indicus), estos diámetros foliculares son de menor tamaño a los obtenidos en nuestro trabajo y posiblemente esto se deba a que se realizó ecografía el día 9 sin la aplicación de BE que estimula la síntesis y secreción de FSH y LH, para favorecer el desarrollo final del folículo, así como su ovulación (Baruselli et al., 2005; Spey et al., 2006), por lo cual podría pensarse que aún no se ha completado la etapa de desarrollo final del folículo preovulatorio. Comparando toda esta información, podemos decir que los resultados obtenidos en los tres protocolos evaluados en vacas criollas en la RSE, son muy adecuados y superan las expectativas para un proceso de transferencia de embriones.

5.6. TAMAÑO DEL CUERPO LÚTEO AL DÍA SIETE POST CELO

El tratamiento uno (GNRH) presentó un promedio de 20 mm de tamaño de CL; el tratamiento dos (LH) presento 20,5 mm y el tratamiento tres (TESTIGO) presentó 17,1 mm.

Según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, 1990) determina que una receptora debe tener un cuerpo lúteo (≥ 16 mm) para que pueda recibir un embrión por transferencia directa.

Según Anchondo. A. (2010) y Lozada. E. (2010), clasifican el Cuerpo Lúteo en tres calidades o categorías:

Calidad 1: mayor a 25 mm de diámetro

Calidad 2: igual a 20 mm de diámetro

Calidad 3: menor 15 mm de diámetro

Siendo los de calidad uno y dos aptos para recibir un embrión y no apto el de calidad tres.

Ledezma et, al. (2011) evaluó el efecto del tamaño del cuerpo lúteo antes de la transferencia embrionaria, para esta investigación utilizaron 57 vacas receptoras de la raza Simmental (9), Simbrah (6), Tuli (7) y cruzas de Simmental x Simbrah (35), el tratamiento de sincronización fue el siguiente al momento de la aplicación del CIDR, se administraron 2.76 mg de benzoato de estradiol IM (Estrol®, Loeffler) y 50 mg de P4 (Progesterona®, Fort Dodge), al retiro del dispositivo CIDR se administraron 25mg de PGF2α (LUTALYSE®, Pfizer, Dinoprost Trometamina o Reprodin, Bayer® Cloprostenol sódico), 24 h después del retiro del CIDR, se administró 1.38 mg de estradiol. La única diferencia en el tratamiento de sincronización para los animales del tratamiento dos fue la administración de 300 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG) en el día 5 del tratamiento (Novormon, Syntex). La media obtenida en el grupo 1 fue 17,4 mm, mientras que en el grupo 2 fue de 18,3 mm, de acuerdo a estos resultados se manifiesta que la

utilización de eCG ayuda a tener un cuerpo lúteo de mayor tamaño. Comparando toda esta información, con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación en donde se obtuvo una media en todos los tratamientos de 19,3 mm, se puede manifestar que estos tamaños son aptos para transferir un embrión sea fresco o congelado y también para mantener una gestación.

6. CONCLUSIONES

- En lo que se refiere al tamaño del ovario funcional al inicio de la sincronización se puede decir que los mismos no influyeron en los tratamientos de sincronización para receptoras empleados, ni en el tamaño del CL al día 7 post celo.

- En los bovinos criollos de la RSE sincronizados con terapia hormonal para recepción de embriones, el tiempo de presentación de celo manifiesto post retiro DIB es de 30,1 horas.

- La aplicación de eCG y además una dosis de GNRH o LH el día del celo prolonga la duración del celo con un tiempo promedio de 21 horas y además se logra una intensidad manifiesta del mismo muy buena.

- La utilización de los tres protocolos hormonales investigados para sincronizar receptoras criollas de la RSE, proporciono un 100% de eficacia en la presentación de celo manifiesto.

- En lo que se refiere a tamaño de folículo preovulatorio los bovinos criollos responden favorablemente a la sincronización, presentando un tamaño promedio de 12,5 mm, al día de presentación del celo.

- Los bovinos criollos de la RSE respondieron favorablemente a la aplicación de protocolos de sincronización para receptoras, presentando un tamaño de 17,1 mm en el tratamiento con BE al día 9, además con la aplicación de LH y GNRH en el momento del celo nos ayuda a tener un cuerpo lúteo de mayor tamaño, 20,5 y 20 mm respectivamente, siendo estos tamaños óptimos para la recepción de un embrión ya que según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, 1990) determina que una receptora debe tener un cuerpo lúteo (≥ 16 mm) para poder transferir un embrión.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la utilización de GNRH y LH en el momento del celo ya que ayuda a la obtención de un cuerpo lúteo de mayor tamaño.

- En lo que se refiere a los costos de una vaca sincronizada para transferencia de embriones se recomienda la utilización de LH ya que esta hormona es de menor valor y se obtienen resultados muy buenos.

- Para obtener mejores resultados dentro de la aplicación de un protocolo de sincronización para receptoras en bovinos criollos se recomienda mejorar las condiciones de manejo (destete de terneros) y alimentación (sobre alimento y sales minerales), unos 20 días previos al inicio del proceso, para así tener animales de buena condición corporal.

- Incorporar técnicas biotecnológicas como son la inseminación a tiempo fijo y la transferencia de embriones en los bovinos criollos de la RSE, ya sea con fines de conservación y/o mejora genética, aplicando cualquiera de los protocolos de sincronización investigados, pues estos animales responden favorablemente a un tratamiento de sincronización.

8. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, T., Hayashi, K., Ohtani, M. and Miyamoto, A. 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. Reproduction 125: 759-767.

Acosta, T. and Miyamoto, A. 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. Animal Reproduction Science 82–83: 127-140.

Adams, G., Matteri, R. and Gither, O. 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. Journal of Reproduction and Fertility 95: 627-640.

Aguirre L; Bermeo A; Maza D. Y Merino L. 2011. Estudio fenotípico y zoométrico del bovino criollo de la sierra media y alta de la región sur del Ecuador (RSE). Actas Iberoamericanas de Conservación Animal 1, 392-397.

Arturo Duica A.; Néstor Tovío L.;Henrry Grajales L. 2007. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de transplante de embriones bovinos. Revista de Medicina Veterinaria, Julio – Diciembre, numero 014 Universidad de la Salle Bogotá Colombia pp.107 -124. Disponible en htt://redalyc.uaemex.mx.

Araújo, M., Vale, V., Ferreira, A., Sá, W., Barreto, J. y de Sá Filho, L. 2005. Secreção de interferon-tau em embriões bovinos produzidos in vitro frescos e congelados. (Interferon tau secretion in cattle embryos in vitro fertilized before and after cryopreservation). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 57: 6-17.

Aviles, M., Cutaia, L., Videla Dorna, I., Aba, M., Bó, G. A. 2005. Concentraciones plasmáticas de progesterona en vacas ovariectomizadas tratadas con dispositivos intravaginales con 0,5 y 1 gramo de progesterona y

previamente utilizados. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina; 384.

Baruselli, P., Marques, M., Madureira, E., Costa Neto, W., Gradinettie, R., Bó, G. 2001. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated whith CIDR-B devices. Theriogenology. 55: Abstract 55 – 355.

Baruselli, P., Reis, E. 2003. Sincronización de receptoras Cebú en condiciones tropicales. Memorias IV Seminario Internacional de reproducción en grandes animales, CGR Biotecnología Reproductiva. Bogotá, Colombia: 35-44.

Baruselli, P., Bó, G., Reis, E., Marques, M., de Sá Filho, M. 2005. Introducción de la IATF en el manejo reproductivo de rebaños de Ganado de engorde en Brasil. Memorias, congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia: 121-137.

Baruselli, P., de Sá Filho, M., Martins, C., Reis, E., Nasser, L. y Bó, G. 2005. Nuevos avances en los tratamiento de súper ovulación en donadoras de embriones. Memorias, Congreso internacional de reproducción bovina. Laboratorio Intervet, Bogotá Colombia: 139-154.

Baruselli, P., Sa´ Filho, M., Martines, C., Nasser, L., Nogueira, M., Barros, C., Bó, G. (2006). Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle Theriogenology 65 77–88 67 67

Barnea, E., Choi, Y. and Leavis, P. 2000. Embryo maternal signaling prior to implantation. Early pregnancy: biology and medicine. 4: 166-175.

Barreto, A. and MacManus C. 2002. The effect of progestagen CIDR device on pregnancy rates in bovine embryo transfer recipients. Theriogenology. 57: 1974-1989.

Bó. G. 200. Manipulación de la dinámica folicular en ganado bovino: Su aplicación en programas de transferencia de embriones. II Simposio Internacional. Argentina.

Bó, G., Baruselli, P., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R. and Mapletoft, R. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. Theriogenology. 57, 1: 53-72.

Bó, G., Moreno, D., Cuaita, L., Caccia, M. 2003. Factores que afectan los porcentajes de preñez en los programas de transferencia de embriones. Memorias IV Seminario Internacional de reproducción en grandes animales, CGR Biotecnología Reproductiva. Bogotá, Colombia: 102-119.

Bousfield, G., Butnev, V. 2001. Identification of twelve O-glycosylation sites in equine chorionic gonadtropin beta and equine luteinizing hormone by solid-phase Edman degradation. Biology of Reproduction, 64: 136-147.

Bowen, J. and Burghardt, R. 2000. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. Seminars in Cell & developmental biology. 11: 93- 104.

Bridges, P., Wright, D., Buford, W., Ahmad, N., Hernandez, H., McCormick, M., Schrick, F., Dailey, R., Lewis, P., Inskeep, E. 2000. Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows. Journal of American Science. 78, 11: 2942 2949.

Colazo, M., Bartolomé, J., Schmitdt, E., illuminati, H., Serrano, B., Moyano, B., Moralejo, R. 1996. Sincronización de los celos combinando progestagenos, GnRH, PGF2α, e inseminacion a tiempo fijo en vacas para carne. Memorias, II Simposio internacional de reproducción animal. Cordoba, Argentina: 254

Colazo M. J. Mapletoft., 2007. Estado Actual y Aplicaciones de la Transferencia de Embriones en Bovinos.

Crowe, M. 2008. Resumption of Ovarian Cyclicity in Post-partum Beef and Dairy Cows. Reproduction in Domestic Animals. 43. 5: 20–28.

Chabbert-Buffet, N., Skinner, D., Caraty, A., Bouchard, P. 2000. Neuroendocrine effects of progesterone. Steroids. 65, 10-11: 613-620.

Chagas, J., Lopez, L., Robalo, J. 2002. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. Theriogenology. 58: 51-59.

Cutaia, L., Moreno, D., Villata, M., Bó, G. 2001. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administrated at device renoval or 24 hours later. Theriogenology. 55:408 abstr.

Cutaia, L, Veneranda, G, Tribulo, R, Baruselli, PS, Bó GA. 2003. Programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en Rodeos de Cría: Factores que lo Afectan y Resultados Productivos. V° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Huerta Grande, Córdoba; 119-132.

Cutaia, L., Alisio, L., Bertero, F., Aviles, M., Bó G.A. 2005. Tasas de preñez en vacas y vaquillonas sincronizadas con DIB y benzoato de estradiol en el momento del retiro del dispositivo o 24 h más tarde. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, abstr.

Demmers, K., Derecka, K., Flint, A. 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. Reproduction. 121: 41-49.

De Moraes, A. and Hansen, P. 1997. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes development of in vitro produced bovine embryos. Biology Reproduction. 57: 1060-1065.

Dominguez Oscar Miguel., 2006. Manual de Transferencia de Embriones en el Ganado Bovino.

Duica, A., Tovío, N. y Grajales, H. 2007. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de trasplante de embriones bovinos. Journal Facultad de Medicina Veterinaria Universidad de la Salle. 14: 107.

Espey, L. 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. Biology of Reproduction. 50: 233- 238.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM., 2010. Reproducción Bovina. Capítulo 10. Pp 1-413. Disponible en: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/10ReproduccionBovina.pdf.

Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. Animal Reproduction Science. 78, 3-4: 203–216.

Fortune, J., Rivera, G. and Yang, M. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenviroment in selection of the dominant follicle. Animal Reproduction Science. 82-83: 109-126.

Green, M., Hunter, M. and Mann, G. 2005. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. Animal Reproduction Science. 88, 3-4: 179-189.

Gonella, A., Grajales, H., Hernández, A. 2010. Ambiente receptivo uterino: control materno, control embrionario, muerte embrionaria. Rev. MVZ. Córdoba. 15, 1: 1976-1984.

Gonzales-Stagnaro, C. 2001. Reproducción bovina. Venezuela. Ed. Fundación Girarz.

Gómez. C. 2005. "Transferencia de embriones experiencias en Colombia" Memorias, congreso internacional de reproducción bovina. INTERVET. Bogotá. Colombia.

Gord on I. 1999. Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos. Zaragoza España. Ed. Acribia.

Gorlach A. 1999. Transferencia de embriones en el ganado vacuno. Zaragoza España. Ed. Acribia.

Gong, J. and Campbell, B. 1995. Evolution of the requirement for FSH and LH during ovarian follicle growth and development in cattle. Journal of Reproduction and fertility. 15. Abstract series.

Gonzales-Stagnaro, C. 2001. Reproducción bovina. Venezuela. Ed. Fundación Girarz.

Green, M., Hunter, M. and Mann, G. 2005. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. Animal Reproduction Science. 88, 3-4: 179-189.

González, A., Wang, H., Carruthers, T.D., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J. 1994. Superovulation in the cow with pregnantmare serum gonadotropin: Effects of dose and antipregnant mare serum gonadotropin serum. *Can Vet J*. 35: 158-162.

Grygar, I., Kudlac, E., Dolezel, R., Nedbalkova, J. 1997. Volume of luteal tissue and concentration of serum progesterone in cows bearing homogeneous corpus luteum or corpus luteum with cavity. Animal Reproduction Science. 49: 77-82.

Gustavo A Palma., 2008. Biotecnología de la Reproducción. Seg Ed, Mar del plata. 163-288p.

Hafez, E. S. E. 1996. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. México. D. F. Sexta Edición. Interamericana. pp. 1 – 523.

Hafez, E.S.E. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. Ed. Mc. Graw Hill.

Hernández, A. y Jiménez, C. 2000. Lecturas sobre reproducción bovina. El ciclo estral de la vaca. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Hernández, A. y Prieto, E. 2001. Lecturas sobre reproducción bovina. Pubertad en la hembra. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Hernández, A., Escobar, F. y Vásquez. 2003. Mortalidad embrionaria en bovinos. Documento. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Hernández, A. y Jiménez, C. 2008. Reproducción en la vaca fisiología y aplicaciones. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Primera edición.

Hernández Cerón, J. y Zarco, L. 1998. Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. Ciencia Veterinaria Mexico 8:1-28.

Huertas, I. y Huertas, V. 1991. Manual práctico y moderno de inseminación artificial. Transferencia de embriones. Reproducir LTDA.

Hunter, M., Robinson, R., Mann, G. and Webb, R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. Animal Reproduction Science. 82–83: 461-477.

IETS ANNUAL MEETING, DENVER, USA, 2008. Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones Sección IV. Disponible en. http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_16_iets.pdf.

Inskeep, E.K. 1995. Factors that affect fertility during oestrous cycles with short or normal luteal phases in postpartum cows. J Reprod Fertil. Suppl; 49:493-503.

Inskeep, E. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. Journal of Animal Science. 82: (E. Suppl.):E24–39.

Ireland, J., Mihm, M., Austin, E., Diskin, M., Roche, J. 2000. Historical prespective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: Key concepts, studies, advancements and terms. Journal of Animal Science. 83: 1648 – 1658.

Jeffcoate, I. and Ayliffe, T. 1995. An ultrasonographic study of bovine cystic ovarian disease and its treatment. The Veterinary Record. 136, 16: 406-410.

Lopez, H., Caraviello, D., Satter, L., Fricke, P and Wiltbank, M. 2005. Relationship Between Level of Milk Production and Multiple Ovulations in Lactating Dairy Cows. Journal of animal Science. 88: 2783-2793.

Madureira, E., Marques, M., Baruselli, P., Nasser, L., Rodrigues C. 2004. Efeito do tratamiento com eCG na taxa de concepção de vacas nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (analise Retrospectiva). Acta Scientiae veterinarae. 32S: 228.

Machado, R., Taveira, R., Bergamaschi, M., Alvarenga, C., Binelli, M. 2006. Sincronizacao da ovulacao em vacas da raca Nelore e seus efeitos na funcao ovariana. Boletin de pesquisa e desenvolvimento. 7, 1ª. Edicao: P.36.

Nasser, L., Reis, E., Oliveira, M., Bó, G., Baruselli, P. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. Animal Reproduction Science. 82, 83: 479–486.

Niswender, G. 2002. Molecular control of luteal secretion of progesterone. Reproduction. 123: 333–339.

Olivera, M., Tarazona, A., Ruiz, T. y Giraldo, C. 2007. Vías implicadas en la luteólisis bovina. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 20: 387-393.

Ohnishi, J., Ohnishi, E. and Shibuya, H. and Takahashi, T. 2005. Functions for proteinases in the ovulatory process. Biochimica et Biophysica Acta 1751: 95-109.

Padmanabhan, V. and Mc Neilly, A. 2001. Is there an FSH-releasing factor. Reproduction. 121: 21-30.

Palma, G.; Brem, G. 1993. Transferencia de Embriones y Biotecnología de la Reproducción en la Especie Bovina. Primera Edición. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aieres - Argentina. pp. 80 –87.

Palma, G. 2001. Biotecnología de la reproducción. Buenos Aires, Argentina. Ed. INTA, Balcare.

Pate J. 1994. Cellular components envolved in luteolysis. Journal of animal Science. 72: 1884-1890.

Porter, D., Harman, R., Cowan, R., Quirk, S. 2001. Relationship of Fas ligand expression and atresia during bovine follicle development. Reproduction. 121: 561-566.

Pursley, J., Wiltbank, M. and Stevenson, J. 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at synchronized ovulation or synchronized estrus. Journal of Dairy Science. 80, 2: 295-300.

Ribadu, A., Dobson, H. and Ward, W 1994. Ultrasound and progesterone monitoring of ovarian follicular cysts in cows treated with GnRH. British Veterinary Journal. 150, 5: 489-497.

Richards, J. 2005. Ovulation: New factors that prepare the oocyte for fertilization. Molecular and Cellular Endocrinology. 234: 75–79.

Rivera, G. Fisiología del ciclo estral de la vaca. 1992. Revista Argentina de Producción Animal. No. 12, 3: 287-300.

Rodina, T., Cooke, F., Hansen, P. and Ealy, A. 2009. Oxygen tension and medium type actions on blastocyst development and interferon-tau secretion in cattle. Animal Reproduction Science. 111, 2-4: 173-188.

Rosales, A., Guzmán, A. 2008. Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. Revista técnica pecuaria de México. 46, 2:159-182

Rosenfeld, C., Wagner, J., Roberts, R. and Lubahn, D. 2001. Intraovarian actions of oestrogen. Reproduction. 122: 215-226.

Sartori, R., Rosa, G and Wiltbank, M. 2002. Ovarian Structures and Circulating Steroids in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. Journal of Dairy Science. 85:2813–2822.

Sartori, R.; Haughian, J.M.; Shaver, R.D.; Rosa, G.J.M.; Wiltbank, M.C. 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. J. Dairy Sci; 87:905-920.

Sánchez, T., Wehrman, M., Bergfeld, E., Petters, K., Kojima, F., Cupp, A., Mariscal, V., Kittok, R., Rasby, R. and Kinder, J. 1993. Pregnancy rate is greater when the corpus luteum is present during the period of progestin treatment to synchronize time of estrus in cow and heifers. Biology of Reproduction. 49: 1102-1107

Sangha, G., Sharma, R. and Guraya, S. 2002. Biology of corpus luteum in small ruminants. Small Ruminants Research. 43,1: 53-64.

Spell, A., Beal, W., Corah, L., Lamb, G. 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. Theriogenology. 56, 2: 287-297.

Spencer, T. Ott, T. and Bazer, F. 1996. Tau interferon: pregnancy recognition signal in the ruminants. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 213, 3: 215-229.

Spencer, T., Johnson, G, Bazer, F., Burghardt, R. and Palmarini, M. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. Reproduction Fertility and Development, 19: 65-78.

Spey, L., Richards, J. 2006. Ovulation en: Knobil and Neill´s Physiology of Reproduction. 1, 11:425-459.

Stocco, C., Telleria, C. and Gibori, C. 2007. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. Endocrine Reviews. 28, 1:117-149.

Tribulo, H. y Col. 1998. Transferencia de Embriones. Curso de Post – Grado en Reproducción Bovina (UNL). Loja – Ecuador. pp. 1 –109.

Tribulo, H. 2002. Curso de post-grado en reproducción bovina. Modulo IV. Transferencia de embriones. CGR. Biotecnología reproductiva. Cap. 1 y 2.

Tribulo H, Bo G. 2006. Biotecnologías Reproductivas. En: Galina C, Valenci J. Reproducción de animales domésticos, 2a. ed. México, Editorial Limusa, S.A. p.539-570.

Vasconcelos, J., Silcox, R., Rosa, G., Pursley, J., Wiltbank, M. 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate, after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. Theriogenology. 52: 1067-1078.

Vasconcelos, J., Sartori, R., Oliveira, H., Guenther, J. Wiltbank, M. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. Theriogenology. 56, 2: 307-314.

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

Webb, R., Garnsworthy, P., Gong, J. and Armstrong, D. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. Journal Animal Science. 82: 63-74.

Wiltbank, J., Zimmerman, D., Ingalls, J., Rowden, W. 1965. Use of progestional compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. Journal of Animal Science. 24: 990-994.

9. ANEXOS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS: "EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN DE CELO PARA RECEPTOTAS EN VACAS CRIOLLAS ADICIONANDO UNA FUENTE EXÓGENA DE GNRH Y LH EN EL MOMENTO DEL CELO"

Anexo 1. Ubicación geográfica del cantón Gonzanamá.

Fuente http://maps.google.com.ec

Anexo 2. Registro de campo para variables del celo

REPETICIONES	TIEMPO DEL RETIRO DIB		TIEMPO DE PRESENTACIÓN DEL CELO POST RETIRO DIB		DURACIÓN DEL CELO		INTENSIDAD DEL CELO				SINTOMATOLOGÍA DEL CELO						OBSERVACIONES
	Fecha	Hora	Fecha	Hora	H. I.	H. F.	Muy Bueno	Bueno	Regular	Baja	1	2	3	4	5	6	
T1 (GNRH)																	
UE 1- 8410	02/04/2013	10:30	03/04/2013	11:00	11:00	04/04/2013 (12:00)	x				x	x	x	x	x	apetito disminuido	
UE 2- 8411		10:10	04/04/2013	8:00	8:00	05/04/2013 (08:00)	x				x	x	x	x	x		
UE 3-2995		11:00	03/04/2013	8:00	8:00	04/04/2013 (14:00)	x				x	x	x	x	x		
T 2 (LH)																	
UE 1-1	05/05/2013	13:00	06/05/2013	15:00	15:00	07/05/2013 (15:00)	x				x	x	x	x	x		
UE 2- 2		12:30	06/05/2013	12:00	12:00	08/05/2013 (21:00)	x				x	x	x	x	x		
UE 3- 5		13:10	07/05/2013	7:00	7:00	07/05/2013 (12:00)			x		x	x					
T 3 (TESTIGO)																	
UE 1- 2994	02/04/2013	15:00	03/04/2013	12:00	12:00	04/04/2013 (6:00)	x				x	x	x	x	x		
UE 2-3	05/05/2013	12:40	06/05/2013	15:00	15:00	07/05/2013 (06:00)		x			x	x	x		x		
UE 3-4		12:30	07/05/2013	6:00	6:00	07/05/2013 (22:00)	x				x	x	x	x	x		

SINTOMATOLOGÍA DEL CELO	
Vulva edematizada	1
Presencia de moco	2
Inquietud	3
Monta y se deja montar	4
Baja de producción	5
Otros	6

3. Anexo. Registro de campo para las medidas de las estructuras ováricas.

TRATAMIENTOS	TAMAÑO OVARIO			TAMAÑO FOLICULO			TAMAÑO CL			OBSERVACIONES
	FECHA INICIO	O. Izquierdo	O. Derecho	FECHA	Ovario	L	FECHA	Ovario	L	
		L	L							
T1 (GNRH)										
UE 1- 8410	26/03/2013	25,3	30,5	04/04/2013	I	16,5	11/04/2013	I	20	
UE 2- 8411		19,3	27,5		D	11,9		D	22	
UE 4- 2995		27,7	32,2		D	14,1		D	18	
T2 (LH)										
UE 1 - 1	28/04/2013	18	20	07/05/2013	I	11,5	14/05/2013	I	19,5	
UE 2- 2		15	20		D	13,6		D	23,6	
UE 3- 5		25	21		I	9,8		D	18,4	
T 3 (Testigo)										
UE 1- 2994	26/03/2013	21	23	04/04/2013	D	16	11/04/2013	D	15	
UE 2- 3	28/04/2013	6	15	07/05/2013	D	7,8	14/05/2013	D	20,3	
UE 3- 4		10	17		D	11,1		D	15,9	

ANEXO 4. Análisis estadístico de las variables

1. Análisis estadístico del tamaño de los ovarios al inicio del tratamiento (mm)

a. Resultados experimentales

Bloques	**Tratamientos**		
	T1 (GNRH)	**T2 (LH)**	**T3 (TESTIGO)**
1	25,3	18	23
2	27,5	20	15
3	32,2	25	17
Promedio (mm)	**28,3**	**21,0**	**18,3**

b. Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	FC	F0,05
BLOQUES	2	23,75	11,87	0,77	6,94
TRATAMIENT	2	160,89	80,44	5,21	6,94
ERROR	4	61,76	15,44		
TOTAL	8	246,40			

No existe diferencia estadística entre los tratamientos

2. Análisis estadístico del tiempo de presentación del celo manifiesto post retiro DIB (Hs)

a. Resultados experimentales

Bloques	**Tratamientos**		
	T1 GNRH	**T2 LH**	**T3 (Testigo)**
1	24,5	26	21
2	45,83	23,5	26,33
3	21	41,83	41,5
Promedio(Hs)	**30,44**	**30,44**	**29,61**

b. Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	FC	F0,05
BLOQUES	2	192,96	96,48	0,652	6,94
TRATAMIENT	2	1,39	0,69	0,005	6,94
ERROR	4	592,16	148,04		
TOTAL	8	786,51			

No existe diferencia estadística entre los tratamientos

3. Análisis estadístico de duración del celo

a. Resultados experimentales

Bloques	**Tratamientos**		
	T1 (GNRH)	**T2 (LH)**	**T3 (TESTIGO)**
1	25	24	18
2	24	33	15
3	30	5	16
Promedio (Horas)	**26,3**	**20,7**	**16,3**

b. Análisis de la varianza

FV	GL	SC	CM	FC	F0,05
BLOQUES	2	80,22	40,11	0,45	6,94
TRATAMIENT	2	150,89	75,44	0,85	6,94
ERROR	4	353,78	88,44		
TOTAL	8	584,89			

No existe diferencia estadística entre los tratamientos

4. Análisis estadístico del tamaño del folículo preovulatorio (mm)

a. Resultados experimentales

Bloques	**Tratamientos**		
	T1 (GNRH)	**T2 (LH)**	**T3 (TESTIGO)**
1	16,5	11,5	16
2	11,9	13,6	7,8
3	14,1	9,8	11,1
Promedio (mm)	**14,2**	**11,6**	**11,6**

b. Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	FC	F0,05
BLOQUES	2	22,04	11,02	1,48	6,94
TRATAMIENT	2	12,84	6,42	0,86	
ERROR	4	29,84	7,46		
TOTAL	8	64,72			

No existe diferencia estadística entre los tratamientos

5. Análisis estadístico del tamaño del cuerpo lúteo al día 7 post celo (mm)

a. Resultados experimentales

Bloques	**Tratamientos**		
	T1 (GNRH)	**T2 (LH)**	**T3 (TESTIGO)**
1	20	19,5	15
2	22	23,6	20,3
3	18	18,4	15,9
Promedio (mm)	**20,0**	**20,5**	**17,1**

b. Análisis de la varianza

FV	GL	SC	CM	FC	F0,05
BLOQUES	2	35,5	17,76	19,86	6,94
TRATAMIENT	2	20,6	10,32	11,54	6,94
ERROR	4	3,58	0,89		
TOTAL	8				

c. Prueba de Duncan

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
2	20,50	3	0,55	A	
1	20,00	3	0,55		A
3	17,07	3	0,55		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Anexo 4. Asistentes a la socialización de los resultados obtenidos

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Lista de asistentes a la socialización de los resultados obtenidos del tema de tesis denominado: "EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN DE CELO PARA RECEPTORAS EN VACAS CRIOLLAS ADICIONANDO UNA FUENTE EXÓGENA DE GNRH Y LH EN EL MOMENTO DEL CELO"

Autor: Rudbel González Briceño

Director: Dr. Lenin Aguirre Riofrio Mg. Sc.

Fecha: 31 de Octubre del 2013.

NOMBRES Y APELLIDOS	C.I.	FIRMA
SANTIAGO GERMAN, CALDERÓN AGUIRRE	1103125397	
Juan Carlos Gaona eH	1104983596	
Angel Emilio Alvarez Rueda	1104865800	
María José Roilova Reyes	1103477442	
María Gabriela Merchán Lapo.	1105594343	
Diana Lucía Granda Abad	1104956626	
Adriana Gissela Quezada Salas	1105434912	
Félix Heraldo Luzón Cevallos	1104934060	
Wilmer Pablo Carillo Torres	1104638307	
Angel Alberto Casierra Cárdenas	1105015380	
Jonathan José Alejandro Cuenca	1104818495	

Juan Pablo Millan Rojas	1104410699	
Luis Antonio Castillo Cevallos	2300129802	
Darío Guera Torres	1104494917	
Edwin Geovanny Mizhquero Rivera	1105224982	
Brian Fernando Guzman Guillazga	1900757947	
Sixto Ehuanula	1300693722	
Edson Leon Acime	1102071426	
Melanio Uchuari Pauta	1104259591	
Manuel D. Quezada	1102167906	
Mary Carmen Cañar Maza	0704445055	
Edo. Cornelio Soto Soto	1104684616	
Robert Zuquilanda Ludeña	1103559165	
Jairo Gonzalez	1105156721	

Anexo 5. Fotografías

Foto 1. Bovinos criollos seleccionados para el Tratamiento 1 (GNRH)

Foto 2. Bovinos criollos seleccionados para Tratamiento 2 (LH)

Foto 3. Bovinos criollos del Tratamiento Control

Foto 4. Palpación transrectal para evaluación de órganos reproductivos.

Foto 5. Determinación del tamaño del ovario por medio de ecografía.

Foto 6. Aplicación de terapia hormonal.

Foto 7. Retiro del DIB y sintomatología del celo.

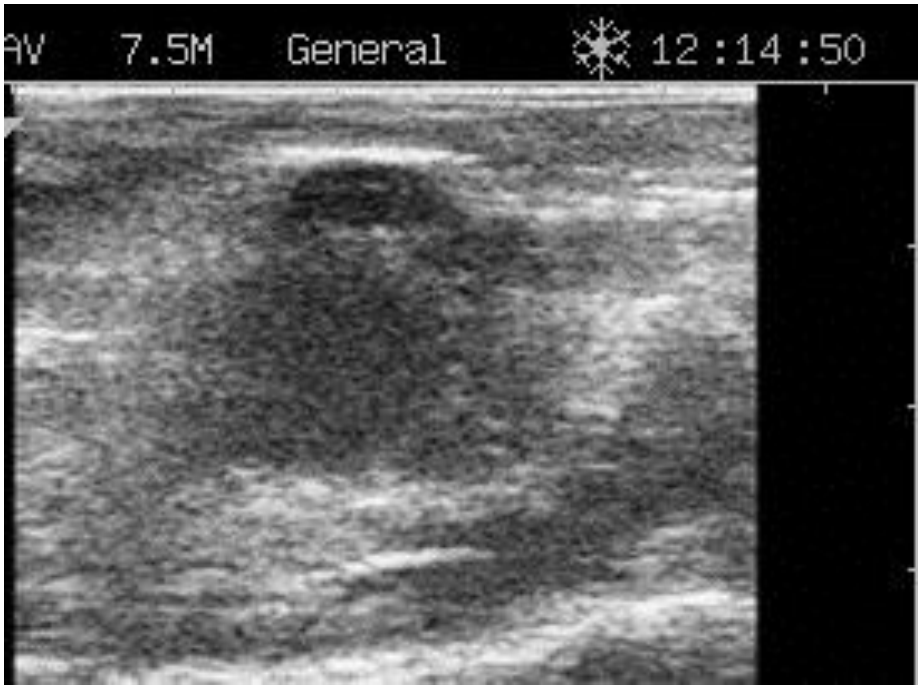


Foto 8. Evaluación del tamaño del folículo preovulatorio.

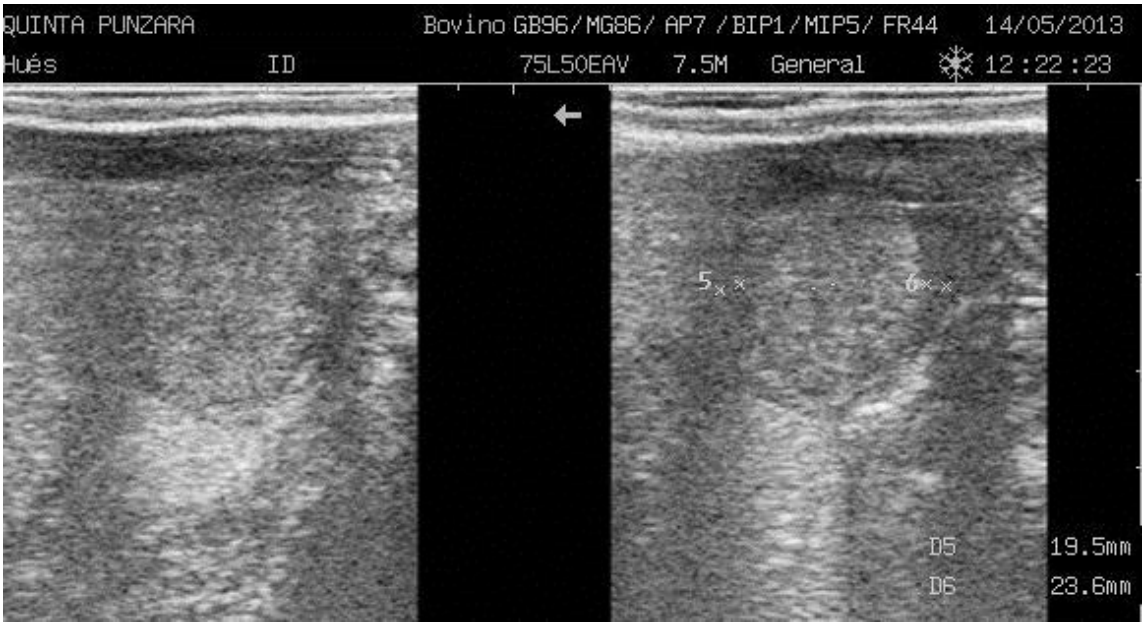


Foto 9. Determinación del tamaño del cuerpo lúteo al día 7 post celo.

Foto 10. Socialización de los resultados obtenidos.

Foto 11. Equipo de trabajo.