

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Evaluación de la solución salina de Ringer como medio de colecta para
embriones de *Bos taurus* y sincronización estral en potenciales receptoras**

José Sebastián Robalino Espinosa

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de
Baccalaureus Scientiae especialización biotecnología

Quito

Noviembre de 2004

**Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias de la vida**

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Evaluación de la solución salina de Ringer como medio de colecta para
embriones de *Bos taurus* y sincronización estral en potenciales receptoras**

José Sebastián Robalino Espinosa

Marcelo Almeida , DVM, MSc.

Director de tesis

(firma)

Marcelo Almeida , DVM, MSc.

Miembro del comité de tesis

(firma)

Gabriel Trueba , DVM, PhD.

Miembro del comité de tesis

(firma)

María de Lourdes Torres, PhD.

Miembro del comité de tesis

(firma)

Hugo Valdebenito, PhD.

Decano del colegio de Ciencias de la Vida

(firma)

Quito, Noviembre de 2004

© Derechos de autor
José Sebastián Robalino Espinosa
2004

Dedicatoria

A la memoria de mis abuelos y seres queridos.

Agradecimientos

Este proyecto de investigación no habría nacido sin el alentador apoyo de Marcelo Almeida. También quiero agradecer a Gabriel Trueba y María de Lourdes Torres por la revisión del manuscrito y sus valiosos comentarios. Mi profundo reconocimiento a José y María Robalino por su cariñoso apoyo durante muchos años.

Resumen

El propósito del presente proyecto fue evaluar el lactato de Ringer como medio de colecta de embriones y determinar la eficiencia de 4 tratamientos de sincronización estral. Para los objetivos mencionados, se trabajó con once hembras de la raza Holstein. Los animales que presentaron cuerpos lúteos se sometieron secuencialmente e independientemente a los 4 tratamientos de sincronización estral. En el primero (1) se usó una sola inyección de prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$). En el segundo (2) se inoculó dos inyecciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$, separadas por 11 días. En el tercero (3) se sincronizó la onda folicular con la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y seguidamente se empleó $\text{PGF}_{2\alpha}$. En el cuarto (4) se prolongó la fase luteal con el uso de progestágenos. De las once hembras dos con códigos 101 y 8 fueron superovuladas, con dosis constantes de la hormona folículo estimulante (FSH). Posterior a lo cual, se inseminó y colectó embriones por lavado uterino con lactato de Ringer. No se recuperaron embriones de la hembra 101. En contraste, del animal 8 se obtuvieron 5 blastocistos con aparentes defectos en la zona pelúcida. Los tratamientos 2, 3 y 4 generaron 40% de estros; en tanto que el tratamiento 1 tuvo un 25% de eficiencia. Los porcentajes de cuerpos lúteos al finalizar cada uno de los tratamientos fueron de 25% en el tratamiento 1, 90% en el tratamiento 2, 60% en el tratamiento 3 y de 40% en el tratamiento 4. Los resultados del proyecto sugieren que el lactato de Ringer no es un medio adecuado para colectar embriones bovinos y que los tratamientos 2, 3 y 4 son 15% más eficientes que el tratamiento 1. Adicionalmente, el tratamiento 2 generó más cuerpos lúteos que los tratamientos 1, 3 y 4.

Abstract

The purpose of the present work was to evaluate Ringer's lactate solution as a medium for collecting bovine embryos and to establish the efficiency of four estrus synchronization treatments. To obtain these objectives, eleven Holstein cows were used. The cows with *corpora lutea* were subjected to four different treatments of estrus synchronization, which were aimed out independently and one after the other. In the first one (1), a single injection of prostaglandin (PGF2 α) was used. In the second one (2), two injections of PGF2 α at 11 day interval were given. In the third one (3), the follicular state was synchronized by using a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) followed by PGF2 α . For the fourth one (4), progesterone was used to prolong the *corpora lutea*. Of the eleven cows, two (with codes 101 and 8) were induced to superovulation. These cows were inseminated and embryos were collected using Ringer's lactate. From cow 101, no embryos were obtained. From cow 8, five blastocysts were collected. These embryos appeared to have damage in the *zona pellucida*. Treatments 2, 3, and 4 generated 40% of estrus and treatment 1 proved to be 25% efficient. The number of *corpora lutea* generated after treatments were: 25% in treatment 1, 90% in the treatment 2, 60% in the treatment 3 and 40% in the treatment 4. The results of this research suggest that Ringer's Lactate is not an ideal medium for bovine embryos collection, that treatments 2, 3, and 4 were 15% more efficient than treatment 1 and that treatment 2 was the most effective in the generation of *corpora lutea*.

Tabla de Contenido

Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Tabla de Contenido.....	viii
Lista de tablas y figuras.....	x
1. Introducción:.....	1
1.1 Fisiología reproductiva y embriología de <i>Bos taurus</i> :.....	1
1.1.1. Origen y mitosis de las células germinales:.....	1
1.1.2. Meiosis de los gametos femeninos:.....	1
1.1.3. Meiosis y maduración estructural de los espermatozoides:.....	1
1.1.4. Estadios foliculares y maduración estructural de los ovocitos:.....	2
1.1.5. Dinámica del desarrollo folicular:.....	3
1.1.5.1. Ondas de desarrollo folicular en <i>Bos taurus</i> :.....	3
1.1.6. Definición y duración del ciclo estral:.....	3
1.1.6.1. Animales cíclicos y acíclicos:.....	4
1.1.7. Regulación neuroendocrina de la ovulación y del ciclo estral:.....	4
1.1.8. Ovulación:.....	4
1.1.9. Transporte espermático:.....	5
1.1.10. Penetración de la <i>corona radiada</i> y del <i>cumulus oportus</i> :.....	5
1.1.11. Anclaje y penetración de la zona pelúcida:.....	5
1.1.12. Ingreso del espermatozoide en el ovocito secundario:.....	6
1.1.13. Activación del ovocito secundario:.....	6
1.1.14. Clivaje y morfología embrionaria:.....	6
1.1.15. El control del ciclo celular durante la segmentación embrionaria:.....	7
1.2. Reproducción asistida en <i>Bos taurus</i> :.....	8
1.2.1. Exploración clínica:.....	8
1.2.2. Selección de animales con fines reproductivos:.....	8

1.2.3. Definición y sistemática de la sincronización estral:.....	8
1.2.3.1. Tratamientos e índices de éxito en la sincronización estral:	9
1.2.4. Definición y metodología de la superovulación:.....	9
1.2.4.1. Índice de éxito en la superovulación:	10
1.2.5. Características del semen congelado:.....	10
1.2.5.1. Inseminación artificial con semen descongelado:	11
1.2.6. Colecta de embriones por gravedad en circuito cerrado:	11
1.2.7. Medios para la colecta de embriones bovinos:.....	11
1.2.7.1. El suero animal en el medio de colecta:	12
1.2.7.2. El lactato de Ringer como medio de colecta:	12
1.2.8. Evaluación de embriones:.....	13
3. Objetivos generales:	15
4. Objetivos específicos:.....	16
5. Área de estudio:.....	17
6. Materiales:	18
7. Métodos:	19
8. Resultados:	22
9. Discusión:	24
10. Referencias:	27
11. Tablas:	29
12. Figuras:.....	32

Lista de tablas y figuras

11. Tablas:	29
Tabla 1. Características del lactato de Ringer:	29
Tabla 2. Aplicación secuenciada e independiente de los tratamientos:.....	29
Tabla 3. Características ováricas post tratamientos y durante la selección:	30
Tabla 4. Monitorización del estro post 48 horas de cada tratamiento:	30
Tabla 5. Tiempo transcurrido para la observación del estro:	30
Tabla 6. Palpación rectal post superovulación y número de embriones:.....	30
Tabla 7. Características de los embriones:	31
12. Figuras:	32
Figura 1. Gráfico del ciclo estral en <i>Bos taurus</i> :	32
Figura 2. Gráfico de los Animales seleccionados para la superovulación:	32
Figura 3. Gráfico de la sincronización del estro con una dosis de PGF2 α :.....	33
Figura 5. Gráfico de la sincronización estral con dos dosis de PGF2 α :	34
Figura 6. Gráfico de la sincronización con progestágeno:	35
Figura 7. Gráfico de la superovulación e inseminación de la hembra 101:.....	35
Figura 8. Gráfico de la superovulación e inseminación de la hembra 8:.....	36
Figura 9. Gráfico de los porcentajes de estros post tratamientos:	37

1. Introducción:

1.1 Fisiología reproductiva y embriología de *Bos taurus*:

1.1.1. Origen y mitosis de las células germinales:

Los precursores de los gametos femeninos y masculinos son los espermatogonios y oogonios; éstos durante el desarrollo embrionario tienen su origen en el epitelio intestinal, de donde migran hacia los primordios de las gónadas. La división celular difiere considerablemente entre los espermatogonios y oogonios. Los últimos merman su proliferación mitótica a causa del ingreso a profase I (PI) y de la apoptosis. En contraste a lo expuesto, la mitosis en los espermatogonios es constante y se realiza en el epitelio seminífero (Bruce, 2000; De la Fuente, 1998; Solomon, 1996).

1.1.2. Meiosis de los gametos femeninos:

La meiosis de los gametos femeninos incluye dos bloqueos secuenciales. Durante la etapa embrionaria los óvulos se constituyen en ovocitos primarios; éstos se encuentran paralizados en PI. En la pubertad algunos de los gametos femeninos se convierten en ovocitos secundarios, los cuales se encuentran en metafase II (MII), etapa que se interrumpe a causa de la fecundación (Bruce, 2000; Wilmut, 2000).

1.1.3. Meiosis y maduración estructural de los espermatozoides:

Los espermatogonios se encuentran en el epitelio seminífero y se dividen en dos clases. La primera se denomina A y representa a la población de células precursoras; las que por mitosis mantienen un número apropiado de espermatogonios. La segunda es clase B y se halla destinada a comenzar la meiosis; la cual en su primera etapa perdura aproximadamente por veinticuatro horas. En dicho período, los gametos masculinos se denominan primarios y producen ácido ribonucleico mensajero (ARNm) destinado, a la traducción de protaminas (Bruce, 2000; De la Fuente, 1998).

Después de la formación de los espermatoцитos primarios, se originan los gametos masculinos secundarios; éstos se encuentran en la segunda división meiótica, la cual una vez concluida permite el origen de gametos inmaduros denominados espermátides. Dichas células entran en espermiogénesis, proceso en el que se evidencia crecimiento flagelar, reducción del tamaño nuclear y condensación del aparato de Golgi. Al finalizar la espermiogénesis, los espermatozoides son transportados al epidídimo, en donde adquieren una capa de glucoproteínas (Bruce, 2000; De la Fuente, 1998).

1.1.4. Estadios foliculares y maduración estructural de los ovocitos:

Se denomina folículo al gameto femenino rodeado de una cubierta de células. El folículo primordial es el estado más inmaduro, se forma en la etapa embrionaria además está conformado por una capa células fusiformes de la granulosa y un ovocito primario. En la etapa neonatal el ovocito primario se encuentra rodeado, por dos capas de células cuboidales de la granulosa. Dicha estructura se denomina folículo primario y en él se desarrolla la *corona radiada* y la zona pelúcida. La última estructura posee receptores de espermatozoides especie específicos, previene la poliesperminación y promueve el movimiento del cigoto dentro del oviducto (Borrero, 1996; Bruce, 2000; Buxadé, 1995).

Posterior al origen del folículo primario se forman los siguientes estados el secundario, el terciario y de Graaf. El folículo secundario se constituye por la proliferación de la células de la granulosa. Dicha acción es mediada por la activina, proteína que forma parte de las moléculas de activación del factor β de transformación de crecimiento. En el folículo secundario el estroma se diferencia en la teca interna y externa. La teca interna es altamente vascularizada así como glandular. En tanto que, la teca externa es una cápsula exterior de tejido conectivo (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; Hafez, 1996).

El folículo terciario posee un espacio entre las células de la granulosa denominado antro; éste se encuentra lleno de líquido folicular, el cual contiene albúmina, hormona leutinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH) y proteoglicanos. El folículo de Graaf posee un antro, más grande que el del folículo terciario, y un ovocito en MII; éste se encuentra

rodeado por células de la granulosa, las cuales en conjunto se denominan *cumulus oortus* (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; Hafez, 1996).

1.1.5. Dinámica del desarrollo folicular:

El desarrollo folicular consta de tres eventos el reclutamiento, la selección y la dominancia. Las tres etapas mencionadas en conjunto se denominan onda folicular. El reclutamiento se divide en dos fases, la inicial, en la cual los folículos primarios crecen por factores intraováricos, y la cíclica, en la que se rescatan de la atresia a los folículos que poseen receptores para FSH. La selección es una acción parácrina, ejercida por el folículo dominante, para disminuir la respuesta a FSH de los folículos primordiales. Dicho proceso es facilitado, por la aparición de receptores de LH en las células de la teca interna y por la disminución de la concentración de FSH. La dominancia es la persistencia del folículo con escasa necesidad de FSH. Dicho evento es mediado por el factor promotor de la insulina (IGF), proteína que permite la persistencia del folículo dominante (Buxadé, 1995; Hafez, 1996).

1.1.5.1. Ondas de desarrollo folicular en *Bos taurus*:

El uso de ultrasonografía ha permitido evidenciar, que en *Bos taurus* existen tres ondas de desarrollo folicular. La primera comienza tres días después del estro y la selección del folículo dominante se presenta seis días después de la ovulación. La segunda se origina de ocho a nueve días post ovulación. La tercera se inicia después de once a doce días del celo y el folículo ovulatorio surge aproximadamente en el día 18 del ciclo estral (Buxadé, 1995; De la Fuente, 1998; Hafez, 1996).

1.1.6. Definición y duración del ciclo estral:

El intervalo de tiempo en cual comienza el celo se denomina ciclo estral, éste es poliéstrico continuo y tiene una duración de 18 a 23 días, dependiendo de las ondas de desarrollo folicular. El ciclo estral posee una fase de formación luteal o metaestro de seis días, un período luteal de 10 días denominado diestro y otro folicular de entre 2 a 7 días llamado

proestro (Figura 1). La ovulación se produce de 11 a 14 horas después del estro, el cual aparece por primera vez a los 11 meses de edad. Cada celo perdura de entre 14 a 15 horas; tiempo en el cual existe un evidenciado incremento en el libido sexual del animal (Buxadé, 2000; Derivaux; Dorn, 1986; Hafez, 1996).

1.1.6.1. Animales cíclicos y acíclicos:

Una vaca cíclica posee niveles séricos de más de 1ng/mL de progesterona, durante la etapa de diestro; además, presenta el celo en un período que oscila entre 18 a 23 días. Las hembras acíclicas por lo general no presentan cuerpos lúteos durante el diestro y son renuentes a los tratamientos de sincronización del celo (De la Fuente, 1998; Stevenson, 2000).

1.1.7. Regulación neuroendocrina de la ovulación y del ciclo estral:

En la pubertad el hipotálamo elabora la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); la cual induce en la adenohipófisis la secreción de FSH Y LH. La FSH insita la proliferación de las células de la granulosa, las que por procesos de aromatización de andrógenos producen estrógenos, los cuales son liberados al torrente sanguíneo con inhibina para disminuir la concentración de FSH y un aumentar los niveles de LH (De la Fuente, 1998; Dorn, 1986; Bruce, 2000; Buxadé, 1995).

Los estrógenos estimulan la liberación de prostaglandina F2 α (PGF2 α) desde el útero. En tanto que, la LH desencadena la ovulación, la cual disminuye la concentración de estrógenos y origina la aparición del cuerpo lúteo. Éste secreta progesterona, hormona que disminuye los niveles de LH y FSH. En animales no gestantes la PGF2 α involuciona el cuerpo lúteo, para la reanudación del ciclo estral (Dorn, 1986; Bruce, 2000; Buxadé, 1995; Hafez, 1996).

1.1.8. Ovulación:

Después de la descarga de LH el ovocito primario entra en MII y el flujo sanguíneo aumenta hacia el ovario. Dicha edematisación genera la liberación de prostaglandinas,

histamina y vasopresina. Dichos mediadores inflamatorios sirven como punto de partida para la producción de colagenasa, enzima que causa el debilitamiento de la pared folicular. Dicho evento, en conjunto con la presión líquido antral y las contracciones del tejido muscular, conducen a la expulsión del ovocito secundario (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; De la Fuente, 1998; Hafez, 1996).

1.1.9. Transporte espermático:

Los gametos masculinos que se han depositado en el tracto genital deben atravesar el cérvix, región que en su interior presenta moco cervical, el cual actúa como filtro de espermatozoides con motilidad progresiva lenta y oscilatoria. En el útero las células seminales son transportadas, por su propia movilidad y por las contracciones del músculo liso, hacia el istmo. En dicha región los espermatozoides se acumulan para entrar en un período de hiperactividad. En él se incrementa la motilidad progresiva rápida, lo cual permite que los gametos alcancen la ampolla (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; De la Fuente, 1998; Dorn, 1986; Wilmut, 2000).

1.1.10. Penetración de la *corona radiada* y del *cumulus oportus*:

Los espermatozoides que han llegado a la ampolla tubárica presentan alteración de las glucoproteínas superficiales, lo cual facilita el ingreso del gameto masculino en el ovocito secundario. Otro factor importante, que permite la penetración de la *corona radiada* y del *cumulus oportus*; es la emisión desde el acrosoma de la enzima hialuronidasa (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; De la Fuente, 1998).

1.1.11. Anclaje y penetración de la zona pelúcida:

La zona pelúcida consta de tres glucoproteínas ZP1, ZP2, y ZP3. Las dos primeras son estructurales y la tercera constituye, el receptor especie específico para proteínas localizadas sobre la cabeza espermática. La unión del gameto masculino con la zona pelúcida permite, el

ingreso de calcio y sodio así como la salida de iones hidrógeno. El flujo iónico mencionado facilita la liberación de acrosina, enzima que digiere las glucoproteínas ZP1 y ZP2 (De la Fuente, 1998; Bruce, 2000; Buxadé, 1995).

1.1.12. Ingreso del espermatozoide en el ovocito secundario:

Las microvellosidades de la membrana ovocitaria envuelven la cabeza del espermatozoide, para formar un cono de fecundación, el cual se contrae para la unión intergametal. Dicho evento es colaborado por la asociación de las moléculas de superficie del espermatozoide, con la integrina $\beta 1$ de la membrana plasmática del óvulo. Una vez que la cabeza espermática ha ingresado en el ovocito secundario, los canales iónicos se abren para permitir la entrada de sodio. El cual ocasiona un cambio en el potencial de reposo desde -70 mV a $+10$ mV. La despolarización celular evita la entrada de varios espermatozoides en el ovocito secundario, a lo cual también colabora la reacción cortical. Ésta comienza con un incremento citoplasmático de la concentración del calcio; ion que promueve la liberación de enzimas para la destrucción de la glucoproteína ZP3 (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; Dorn, 1986; Wilmut, 2000).

1.1.13. Activación del ovocito secundario:

La activación del ovocito secundario se produce después de la fecundación e involucra dos procesos, la culminación de la meiosis y el inicio de la segmentación celular. Al finalizar la meiosis se restablece la membrana nuclear y se expulsa el segundo cuerpo polar. En el inicio del clivaje embrionario los pronúcleos entran en la fase S y posteriormente se integran, en la etapa bicelular del embrión (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; Wilmut, 2000).

1.1.14. Clivaje y morfología embrionaria:

La segmentación forma después de 5 a 6 días de la fecundación, un agregado celular denominado mórula. Dicha estructura tiene dos estados un temprano y un tardío. Los blastómeros de la mórula tardía bombean sodio al interior del embrión, para construir el blastocele. Está cavidad con las células embrionarias que la rodean se denominan en conjunto

blastocisto. En dicha estructura los blastómeros se diferencian en el trofoectodermo, que da origen a la placenta, y en la masa celular interna (MCI), la cual se constituye en el primordio de las capas embrionarias. El blastocisto tiene algunos estados:

- Blastocisto temprano: Se presenta de 6 a 7 días post fecundación y tiene un blastocele pequeño.
- Blastocisto tardío: Se genera los 7 o 8 días de la fecundación y en su morfología se distingue un blastocele amplio.
- Blastocisto expandido: Se origina a los 8 o 9 días de la fecundación y en él se puede apreciar un blastocele muy amplio.
- Blastocisto eclosionado: Se presenta a los 9 o 10 días de la fecundación y el embrión no se encuentra rodeado por la zona pelúcida.
- Blastocisto eclosionado expandido: Se origina a los 10 o 11 días de la fecundación y el blastocele se encuentra muy expandido (Bruce, 2000; De la Fuente, 1998; Dorn 1986; Wilmut, 2000).

1.1.15. El control del ciclo celular durante la segmentación embrionaria:

El ciclo celular durante la segmentación embrionaria está controlado por factores procedentes del citoplasma, entre los cuales están los que inducen a la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Éstos se denominan factores permisivos y se ponen en contacto con el material genético al final de la profase, que es cuando la membrana nuclear desaparece, a causa del factor promotor de la maduración (MPF). Dicho complejo proteínico induce la condensación de los cromosomas y estimula la formación del huso mitótico (Bruce, 1996; Wilmut, 2000).

El MPF disminuye al término de la mitosis para la restauración de la membrana nuclear y para que los factores permisivos permanezcan en el interior del núcleo celular. El MPF es un complejo integrado por cinasas, como la proteína ciclo de división celular 2 (CDC2) y la ciclina B. En el transcurso del ciclo celular la CDC2 se mantiene en niveles constantes. En contraste a lo mencionado, la concentración es mayor en la etapa de mitosis

para la ciclina B. La cual es estabilizada por el factor de control de sistema (CSF); él que es afianzado solo en la ausencia de calcio iónico (Bruce, 1996; Wilmut, 2000).

1.2. Reproducción asistida en *Bos taurus*:

1.2.1. Exploración clínica:

El estudio de las hembras que participan de un programa de reproducción asistida, conlleva el análisis de síntomas y signos que son indicativos del estado reproductivo de los animales. El celo es un síntoma que frecuentemente es monitorizado, para lo cual es importante notar si hay un cambio en el libido sexual, éste se puede expresar de forma visible por la monta entre hembras bovinas. Los signos que habitualmente se estudian son el estado ovárico y el estado de gestación. En dichos casos se utiliza la palpación rectal, técnica en la que se introducen en el recto la mano y el brazo para percibir folículos, cuerpos lúteos y membranas fetales. Las últimas estructuras indican, que los animales atraviesan por un proceso de gestación. Durante la palpación rectal, los folículos se perciben como elevaciones blandas y los cuerpos lúteos se distinguen por su forma globosa, que los separa del cuerpo ovárico (Derivaux, 1990).

1.2.2. Selección de animales con fines reproductivos:

Los animales que se seleccionan con fines reproductivos deben presentar de preferencia partos anteriores registrados, regularidad en el ciclo estral, ausencia de gestación y buen estado sanitario. Adicionalmente, las hembras donantes deben poseer, una producción láctea superior a la media del rebaño (Dorn, 1986; Hafez, 1996; Lindsell, 1986).

1.2.3. Definición y sistemática de la sincronización estral:

La sincronización del ciclo estral es la regulación del celo en grupo de hembras. Dicho objetivo es cumplido con el uso de hormonas reproductivas, que posterior a su uso permiten el advenimiento del estro en un tiempo homogéneo. La metodología incluye dos opciones, la primera utiliza PGF2 α , para generar la involución del cuerpo lúteo, y la segunda prolonga, la

fase luteal con el uso de progestágenos. El momento ideal para aplicar un tratamiento de sincronización, se encuentra relacionado con la etapa del ciclo estral. Es aconsejable que las hembras presenten cuerpos lúteos cuando se decide aplicar PGF2 α y estrógenos. De no presentarse la condición mencionada, se recomienda acelerar la dinámica del desarrollo folicular con el uso de GnRH, hormona que evita la prolongación del proestro (Centro latinoamericano de educación a distancia, 2000; De la Fuente, 1998; Dorn, 1986; Hafez, 1996).

1.2.3.1. Tratamientos e índices de éxito en la sincronización estral:

La mayoría de los tratamientos utilizados hacen uso de PGF2 α , estrógenos, GnRH y progestágenos. Dichas hormonas son administradas basándose en el estado ovárico y en el diseño de los tratamientos. Actualmente existen varios tratamientos, dentro de los cuales cuatro han tenido gran difusión. El primero aplica en fase luteal una sola inyección de PGF2 α y tiene, aproximadamente un éxito del 50% en vacas cíclicas. El segundo administra dos inyecciones de PGF2 α separadas por 11 días y origina, el celo en un 29% en los animales acíclicos y en un 72% en las hembras cíclicas (Stevenson, 2000; De la Fuente, 1998).

El tercer tratamiento emplea GnRH en fase folicular o luteal seguido, a los 6 o 7 días de PGF2 α . Los resultados del tratamiento mencionado tienen un éxito aproximado del 85% en vacas cíclicas y del 41% en hembras acíclicas. La cuarta metodología usa en fase luteal estrógeno e implantes de progestágeno. Después de 9 días de lo mencionado se aplica GnRH más PGF2 α y el implante de progesterona es retirado en el día 10. La eficiencia del último tratamiento mencionado se encuentra en estudio (De la Fuente, 1998; Stevenson, 2000).

1.2.4. Definición y metodología de la superovulación:

La superovulación es la generación del crecimiento folicular múltiple y se obtiene con el uso de hormonas gonadotrópicas. Los tratamientos superovulatorios deben realizarse entre los días 8 a 12 del ciclo estral, siendo de éstos el 9 el más propicio, porque en éste comienza la segunda onda de desarrollo folicular. Los tratamientos incluyen el uso de extractos de

pituitaria FSH, gonadotropina coriónica equina (PMSG) y FSH recombinante (FSHr). Los extractos de pituitaria FSH tienen una vida media baja en el plasma; por lo que, se aplican en 8 dosis constantes o decrecientes con intervalos de 12 horas. La PMSG, por persistir más de 10 días en el sistema circulatorio, se administra en una sola dosis seguida de PMSG neutra. La FSHr actualmente se encuentra en estudio, pero su uso podría ser prometedor, tomando en cuenta la gran pureza de los productos recombinantes (De la Fuente, 1998).

1.2.4.1. Índice de éxito en la superovulación:

La eficiencia de un tratamiento superovulatorio puede medirse por el número de cuerpos lúteo o por la cantidad y calidad de los embriones colectados post inseminación. El éxito de la superovulación depende del estado endocrino y nutricional, de la dinámica folicular, de la constitución genética y de los tratamientos de superovulación aplicados. Dichos factores determinan que la respuesta superovulatoria sea muy variable. Sin embargo, aproximadamente se puede recuperar 6 embriones en el 54% de los casos, que se aplicó gonadotropinas en el día 9 del ciclo estral y en animales con estados nutricionales óptimos. La calidad y el número de embriones se vio que disminuyen cuando las gonadotropinas son aplicadas en la primera y la tercera onda de desarrollo folicular (De la Fuente, 1998; Elsdén, 1989).

1.2.5. Características del semen congelado:

El semen previa congelación pasa por un proceso de evaluación, en el cual se analizan la morfología, la concentración y la motilidad espermática. Dichas variables deben presentar o superar los siguientes valores 70% de morfología normal y 60% de motilidad progresiva rápida. La concentración espermática posterior a la criopreservación, así como los diluyentes empleados en la congelación, pueden variar y su valor o clase dependen de la concentración espermática del eyaculado y de la compañía biotecnológica (De la Fuente, 1998).

Algunos de los diluyentes empleados para la criopreservación son Andromed, Triladyl y Biladyl (Minitub; Alemania). En todo caso, la mayoría de las soluciones ofrecen un aporte

adecuado de energía, crioprotectores, buffers, antibióticos y electrolitos. El semen diluido es almacenado en tanques de nitrógeno líquido, a temperaturas que van desde -192 a -196 °C. Dichos valores son dependientes del grado de pureza del nitrógeno (De la Fuente, 1998).

1.2.5.1. Inseminación artificial con semen descongelado:

La inseminación artificial es el depósito de semen en el aparato genital de la hembra. La metodología se basa en el descongelamiento del semen en baño maría, seguido de la inoculación seminal. Dicha operación generalmente se realiza 12 horas después del estro o 48 post PGF2 α . El instrumental apropiado para realizar la inseminación incluye una pistola y una sonda transvaginal. Dichos instrumentos son guiados mediante palpación rectal, con el objetivo de liberar los gametos masculinos en la parte anterior del cérvix (Centro latinoamericano de educación a distancia, 2000; Dorn, 1986; Hafez, 1996).

1.2.6. Colecta de embriones por gravedad en circuito cerrado:

La recuperación de embriones por gravedad en circuito cerrado es una técnica no quirúrgica, que permite la extracción de embriones desde los oviductos. La técnica se realiza de 7 a 8 días post inseminación y se basa en el lavado de los cuernos uterinos, con el medio de colecta. El instrumental para la recuperación de embriones bovinos incluye un filtro embrionario y un catéter Foley, de dos vías con balón inflable. La sonda Foley mediante palpación rectal es introducida a uno de los dos cuernos uterinos. En dicha región el balón es inflado, con el objetivo generar una cámara hermética, que pueda retener al medio de colecta. Dicha solución corre por gravedad desde el cuerno uterino hacia el filtro embrionario, en donde los embriones son retenidos (De la Fuente, 1998; Dorn, 1986; Hafez, 1996).

1.2.7. Medios para la colecta de embriones bovinos:

Los medios para la recuperación de embriones tienen por objetivo permitir el metabolismo embrionario. La solución que actualmente se utiliza para la colecta de embriones bovinos es el Dulbecco y se encuentra constituida por buffers de base fosfato, sales de cloro, piruvato, glucosa además es suplementado con 1 a 2% de suero inactivado fetal bovino o de

ternero recién nacido. Otros medios que se podrían utilizar para la colecta de embriones son el TCM-199, HAM F-10, lactato de Ringer y MEM; éstos al igual que el Dulbecco se pueden suplementar con suero (De la Fuente, 1998).

1.2.7.1. El suero animal en el medio de colecta:

El suero se usa en el medio de colecta porque funciona como antioxidante. Sin embargo, tiene un alto índice de contaminación biológica, es de composición variable y está asociado a una excesiva producción de lactato, a lo cual puede estar vinculado algún tipo de daño mitocondrial. Actualmente se pretende remplazar el suero animal con el uso de agentes quelantes, suero sintético y albúmina. El desarrollo de embriones de *Bos taurus* en medios carentes de suero animal, ha llegado hasta la etapa de blastocisto eclosionado, partiendo desde el estado de cigoto (Calderón, 1998; Diamond, 1998; Olson, 2000).

1.2.7.2. El lactato de Ringer como medio de colecta:

La solución salina de Ringer posee lactato, sales de calcio y cloro. El calcio podría inhibir el CSF, permitiendo que la mitosis se produzca con una frecuencia homóloga al desarrollo embrionario *in situ*. El lactato funciona como fuente energética. Los valores de los factores químicos y físicos son pH de 7.0 y osmolaridad de entre 270 a 300 mOsm/L (Tabla 1) (Ahumada, 1998; Borrero, 1996; De la Fuente, 1998; Dorn, 1986; Hafez, 1996).

1.2.8. Evaluación de embriones:

La evaluación embrionaria tiene como propósito eliminar los embriones de mala calidad. Para lograr dicho objetivo se analizan las siguientes variables:

- Estado de desarrollo: La morfología embrionaria debe estar de acuerdo con el día de colecta; tomando como referencia la fecha de la inseminación.
- Apariencia de la zona pelúcida: Deben estar ausentes de la zona pelúcida los fragmentos y las rupturas.
- Morfología de los blastómeros: Las células embrionarias deben ser regulares en el tamaño y la forma.
- Características de las membranas celulares: La distensión y la ausencia de rigidez son indicativos del buen estado de las membranas.
- Apariencia del citoplasma: El citosol de los blastómeros no debe ser granuloso (Ahumada, 1998; Borrero, 1996).

2. Justificación:

La utilización de suero animal en los medios para embriones, es un remanente del cultivo de células eucarióticas diploides. Cultivando *in vitro* embriones, de ratones, bovinos, humanos y porcinos en soluciones salinas, se a descubierto que el suero no es imprescindible para el desarrollo embrionario. Los embriones bovinos actualmente se recuperan con la solución de Dulbecco; la misma que se suplementa con suero, el cual podría absorber los factores de crecimiento del fluido de los oviductos, reduciendo así la tasa de implantación. Por lo tanto, es indispensable conocer si el suero es un requisito indispensable, durante la fase de preimplantación embrionaria bovina. Dicho objetivo, se puede cumplir recuperando embriones con medios salinos carentes de suero como el lactato de Ringer.

Por otra parte, actualmente se utilizan combinaciones de $PGF2\alpha$, estrógenos, progesterona y GnRH para la sincronización estral. Los diseños de los tratamientos a base de las hormonas mencionadas tienen porcentajes de éxito no homólogos. Por lo tanto, la diferencia en la etapa del ciclo estral entre los animales donantes y receptores, podría ser de más de 24 horas. Dicho factor afecta la implantación embrionaria, variable que es dependiente al estado endocrino de las hembras, que participan de un programa de transferencia de embriones. Por lo expuesto, es indispensable determinar cuáles son los tratamientos de sincronización estral más idóneos.

Si bien en el Ecuador no se realiza masivamente la transferencia de embriones, la utilización esporádica de dicha técnica, se lleva a cabo usando medios salinos para la colecta y tratamientos de sincronización estral que no son los más idóneos. Por lo expuesto, es indispensable determinar si la solución salina de Ringer es un medio eficaz para la recuperación de embriones y evaluar cual es el tratamiento de sincronización estral más eficiente. Dichos objetivos podrían ayudar a innovar la técnica de transferencia de embriones bovinos en el Ecuador.

3. Objetivos generales:

- Evaluar la solución salina de Ringer como medio de colecta de embriones bovinos.
- Establecer el mejor tratamiento de sincronización estral, dentro de los usados en este proyecto.

4. Objetivos específicos:

- Determinar el tiempo requerido para la aparición del estro, posterior a la aplicación de cada uno de los tratamientos de sincronización estral.
- Establecer el porcentaje de cuerpos lúteos, posterior a la finalización de cada uno de los tratamientos de sincronización estral.
- Determinar si los embriones recuperados se encuentran en el estado de desarrollo idóneo, para el día de la colecta.
- Evaluar en los embriones la zona pelúcida, las membranas celulares, la morfología y el citoplasma de los blastómeros.

5. Área de estudio:

El área en la que se realizó el estudio fue la hacienda Cuandina ubicada en la parroquia Amaguaña y el laboratorio Genteclab situado en la urbanización los Ángeles, San Rafael.

6. Materiales:

Hormonas:

- Estrógeno (Crestar, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda).
- FSH (Folltropin-V, Bioniche; Ontario Canadá).
- GnRH (Fertagyl, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda).
- Implantes de progestágeno (Crestar, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda).
- PGF2 α . (Iliren, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda).
- PGF2 α (Lutalyse, Pharmacia and Upjohn Co; Kalamazoo, MI, USA).

Insumos principales:

- Cajas petri de evaluación embrionaria (Minitub; Alemania).
- Catéter Foley de 2 Vías (Minitub; Alemania).
- Catéteres de inseminación (Minitub; Alemania).
- Copa y filtro embrionario (EMCON, Minitub; Alemania).
- Esteriomicroscopio.
- Lidocaína al 2%.
- Pajuelas seminales (Sersia; Alemania).
- Pistola de inseminación 0.5ml (Minitub; Alemania).
- Solución salina de Ringer (LIFE; Ecuador).

7. Métodos:

7.1. Selección de animales:

Para la sincronización estral, se seleccionaron once hembras Holstein con ausencia de gestación y regularidad en el ciclo estral. Dichas variables se analizaron por palpación rectal; ésta se efectuó con guantes ginecológicos e introduciendo la mano en el recto de los animales. Para la superovulación, se eligieron de las once animales dos con códigos 101 y 8 (Figura 2 a y b); éstos tenían la edad de 8 y 9 años respectivamente, antecedentes previos de parto y una producción láctea superior a la media del rebaño.

7.2. Sincronización estral:

Se utilizaron cuatro tratamientos de sincronización estral. El primero (1) se basó en la aplicación de 2.5ml de PGF2 α (Iliren, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda) (Figura 3). En el segundo (2) se sincronizó la onda folicular con 2.5ml GnRH (Fertagyl, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda), y después de 18 días se aplicó de 2.5ml PGF2 α (Lutalyse, Pharmacia and Upjohn Co; Kalamazoo, MI, USA) (figura 4). El tercero (3) consistió en la utilización de dos dosis de 5ml PGF2 α (Iliren, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda) separadas por 11 días (Figura 5). El cuarto (4) se basó en la inoculación de un implante de progestágeno (Crestar, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda) más 2ml de estrógeno (Crestar, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda); seguido después de 9 días de una inyección de 5ml de PGF2 α (Iliren Intervet international B. V; Boxmeer Holanda) y 2ml de GnRH (Fertagyl, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda). El implante de progestágeno fue retirado en el día 10 (Figura 6).

Los 4 tratamientos se aplicaron secuencialmente, independientemente y sólo en los animales que poseían cuerpos lúteos. Dicha característica ovárica fue dilucidada mediante palpación rectal, técnica que se realizó al inicio y a la finalización de cada uno de los tratamientos para la sincronización estral (Figuras 3, 4, 5 y 6). Para la aplicación secuenciada de los tratamientos se usaron 8 animales en el tratamiento 1, 7 animales para el tratamiento 2,

7 animales para el tratamiento 3 y 4 animales para el tratamiento 4. Adicionalmente, se aplicó el tratamiento 2 en 3 animales, el tratamiento 3 en 3 animales y el tratamiento 4 en un animal (Tabla 2).

7.3. Monitorización estral:

Después de 48 horas de cada uno de los tratamientos se monitoreo visualmente el líbido sexual de los animales (Figuras 3, 4, 5 y 6). Para lo dicho, se realizaron observaciones durante 96 horas en intervalos de 360 minutos.

7.4. Superovulación:

La superovulación en las hembras 101 y 8 se realizó con dosis constantes de FSH (Folltropin-V, Bioniche; Ontario Canadá). Éstas se aplicaron en ocho inyecciones de 2.5ml con intervalos de doce horas. La hembra 101 fue superovulada en el transcurso del tratamiento 3. El animal 8 fue superovulado durante la aplicación del tratamiento 4 (Figuras 7 y 8).

7.5. Inseminación artificial:

Después de 48 horas del tratamiento 3 el animal 101 fue inseminado. Para lo dicho se utilizaron tres dosis seminales; las cuales fueron aplicadas en intervalos de doce horas (Figura 7). Después de dos días del tratamiento 4 la hembra con código 8 se inseminó, dos veces en intervalos de 12 horas (Figura 8). Las pajuelas seminales (Sersia; Alemania) que se usaron eran de 0.5ml con 80% de espermatozoides normales, 80% motilidad progresiva rápida y 20 millones de gametos masculinos por mililitro. Para cada una de las inseminaciones, las pajuelas se descongelaron a 35 °C por 45 segundos y se cargaron en la pistola de inseminación (Minitub; Alemania). Este último instrumento fue introducido en el tracto genital con un catéter (Minitub; Alemania), con el objetivo de liberar los gametos masculinos en la parte anterior del cérvix.

7.6. Colecta de embriones:

Previa a la recuperación de embriones en las hembras 101 y 8 se estimó por palpación rectal el número de cuerpos lúteos. Posteriormente en cada animal se realizó la anestesia epidural con 5ml de lidocaína al 2%. La colecta de embriones se efectuó, 7 días después de la última inseminación (Figuras 7 y 8), con la técnica de gravedad en circuito cerrado. En la realización de esta última técnica, mediante palpación rectal se introdujo el catéter Foley (Minitub; Alemania) al cuerno uterino. En dicha región el balón de la sonda fue inflado. Seguidamente se unió al catéter Foley, el filtro embrionario y el recipiente con lactato de Ringer (LIFE; Ecuador) a 37°C. Se permitió la entrada del medio de colecta al cuerno uterino, el cual fue masajeadado. Inmediatamente, se abrió la llave de salida para la evacuación del medio de colecta, el cual se dirigió hacia el filtro embrionario. Finalmente, el balón del catéter fue desinflado y la sonda Foley retirada del lumen uterino.

7.7. Búsqueda y evaluación embrionaria:

La búsqueda y evaluación embrionaria se realizó bajo esteriomicroscopio (20X). Los embriones encontrados permanecieron, en el lactato de Ringer por aproximadamente 15 minutos y fueron evaluados por el estado de desarrollo, apariencia de la zona pelúcida, morfología de los blastómeros, aspecto del citoplasma y por las características de las membranas de las celulares.

8. Resultados:

8.1. Características ováricas post tratamientos de sincronización estral:

Los porcentajes de formación de cuerpos lúteos no fueron semejantes después de la aplicación de cada uno de los tratamientos para sincronización estral. El tratamiento 2 fue el más eficaz para la formación de cuerpos lúteos. El tratamiento 3 fue 30% menos eficiente que el tratamiento 2, él cual generó 20% más de cuerpos lúteos que el tratamiento 4, éste formó 15% más de cuerpos lúteos que el tratamiento 1 (Tabla 3).

8.2. Monitorización estral post 48 horas de cada tratamiento:

Los porcentajes de síntomas de estro fueron semejantes, después de la aplicación de cada uno de los tratamientos para la sincronización estral. Los tratamientos 2, 3 y 4 tuvieron una eficiencia del 40% y generaron 15% más de celos que el tratamiento 1. Él cual tuvo un 25% de eficacia (Tabla 4).

8.3. Períodos de tiempo transcurridos para la observación del estro:

El tiempo transcurrido para la apreciación de síntomas de celo fue semejante después de la aplicación de cada uno de los tratamientos. Los tratamientos 2, 3 y 4 generaron el estro 36 horas antes que el tratamiento 1; él cual indujo el celo después de 96 horas de su aplicación (Tabla 5).

8.4. Características ováricas y número de embriones colectados:

Los porcentajes, de cuerpos lúteos posterior a la superovulación y el número de embriones colectados después de la inseminación, fueron variables entre las hembras donantes. La hembra 8 generó 40% más de cuerpos lúteos que el animal 101. No se observaron embriones en el medio de colecta proveniente de la hembra 101. Se recuperaron 5 blastocistos del animal 8 (Tabla 6).

8.5. Características de los embriones:

Los 5 embriones provenientes de la hembra 8 tenían características semejantes e imperfecciones en la zona pelúcida. Éstas incluyen desprendimiento, rupturas, adherencias e irregularidades. Los embriones se encontraban en el estado de blastocisto tardío y poseían citoplasmas no granulosos, blastómeros regulares y distensión en las membranas celulares (Tabla 7).

9. Discusión:

De la hembra número 8 se recuperaron 5 blastocistos, con aparentes defectos en la zona pelúcida. Dichas fallas no son frecuentes según Olson et al. 2000, quienes cultivaron embriones en medios salinos libres de suero y con antioxidantes, desde el estado de cigoto hasta la fase de blastocisto expandido. Las glucoproteínas pudieron verse afectadas, de acuerdo con el trabajo de Moor et al. 1984, por la genética, la edad, el estado nutricional y la fisiología del animal. Dichos factores determinan de acuerdo con la investigación de Looney et al. 1986, que en el 24% de los casos las donantes produzcan embriones en mal estado y que en el 64% de las superovulaciones, las hembras oferentes elaboren embriones de buena y mala calidad. La hembra 8 fue superovulada durante el tratamiento 4, el cual hizo uso de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), progesterona, prostaglandina F₂α (PGF₂α) y estrógenos. Dichas hormonas conforme a la investigación de Savage et al. 1987, pueden provocar ovulaciones en momentos inapropiados, generando así embriones de mala calidad (De la Fuente, 1998; Diamond, 1998; Hafez, 1996; Olson, 2000).

No se observó embriones en el medio de colecta proveniente de la vaca 101. Según el trabajo de Elsdén et al. 1986, de cada animal se debería recuperar 6 embriones. Por lo tanto, en el animal 101 la respuesta superovulatoria no fue ideal. Dicha condición de acuerdo con la investigación de Lindsell et al. 1986, puede deberse al momento del tratamiento con relación al ciclo estral y a la presencia de un folículo dominante, el cual puede provocar atresia folicular. Además, es probable que la hembra 101 haya poseído folículos en proceso de atresia. Dicha condición, conforme al estudio de Monniaux et al. 1983, disminuye la respuesta a los tratamientos superovulatorios (De la Fuente, 1998; Elsdén, 1989).

En este trabajo se observó que el tratamiento 1 (una inyección de PGF₂α) tuvo un éxito del 25%; en tanto que los tratamientos 2 (una inyección de GnRH seguida después de 18 días de la aplicación de PGF₂α), 3 (dos inyecciones de PGF₂α separadas por 11 días) y 4 (prolongación de la fase luteal con el uso de progestágenos) obtuvieron un 40% (Figura 9). Dichas cifras son mayores a la tasa espontánea de celo, la cual según Stevenson et al. 2000 es del 16%. El tratamiento 3 fue 15% más eficiente que el número 1. Este resultado puede

deberse a que después de la segunda aplicación de PGF2 α del tratamiento 3, los animales se encontraban entre los días 8 y 17 del ciclo estral. Dicho período de tiempo de acuerdo con De la Fuente et al. 1998, es óptimo para la aplicación de las prostaglandinas. El tratamiento 1 fue 15% menos eficiente que el número 2. Dicho resultado puede deberse a la aplicación de GnRH en el tratamiento 2; dicha hormona según Hafez et al. 1996, predispone la formación de cuerpo lúteo. Estas estructuras según Stevenson et al. 2000, son necesarias al momento de sincronizar el estro con PGF2 α (De la Fuente, 1998; Hafez, 1996; Stevenson, 2000).

Los tratamientos 2, 3 y 4 tuvieron una eficiencia del 40%. A pesar de esta semejanza, la formación de cuerpos lúteos fue diferente, 90% posterior a la aplicación del tratamiento 2 y 60% después del tratamiento 3. De acuerdo con Stevenson et al. 2000, un tratamiento de sincronización estral es mejor cuando posterior a su aplicación, permite la formación de cuerpos lúteos. Por lo tanto, el tratamiento número 2 fue superior al tratamiento 3 y 4. Es probable, que dicho resultado se deba a que previa aplicación de PGF2 α , en el tratamiento 2 se usó GnRH. Dicha hormona según Carlson et al. 2000, facilita la formación de cuerpos lúteos y genera de esta manera la condición ideal para la aplicación de PGF2 α (Carlson 2000; Stevenson, 2000).

Los animales mostraron síntomas de celo a las 60 horas de haber aplicado los tratamientos 2, 3 y 4. Dicho resultado coincide con De la Fuente et al. 1999, quien sostiene que el estro debe presentarse de 60 a 72 horas, después de haber aplicado algún tipo de tratamiento para la sincronización estral. En contraposición a los resultados de los tratamientos 2, 3 y 4, el estro se presentó después de 96 horas de la utilización de tratamiento 1. Este resultado según Iglesias et al. 1979, puede deberse al momento del ciclo estral, en el cual fueron aplicadas las prostaglandinas (De la Fuente, 1998; Diamond, 1998; Hafez, 1996; Olson, 2000).

Si bien los resultados del proyecto son insuficientes para llegar a una conclusión; los datos obtenidos sugieren que el lactato de Ringer no es un medio ideal para la colecta de embriones bovinos, que el tratamiento número 2 forma más cuerpos lúteos que los tratamientos 1, 3 y 4; que los tratamientos 2, 3 y 4 consiguen un 15% más de celos visibles que el tratamiento 1; y que los tratamientos 2, 3 y 4 generan el celo 48 horas antes que el

tratamiento 1. Por lo expuesto, se debería experimentar con más medios para la recuperación embrionaria desde los oviductos y para la realización de transferencias embrionarias se recomienda el tratamiento 2, para la sincronización estral entre donantes y receptoras.

10. Referencias:

1. Ahumada A, Sepúlveda S. 1998. Manual de procedimientos de reproducción asistida. Red latinoamericana de reproducción asistida; Santiago de Chile.
2. Borrero C, Sepúlveda S. 1996. Primer taller de criopreservación de embriones. Red latinoamericana de reproducción asistida; Santiago de Chile.
3. Buxadé C. 1995. Zootecnia bases de la reproducción animal. Mundi prensa; Madrid.
4. Carlson B. 2000. Embriología y biología del desarrollo. Harcourt; Madrid.
5. Centro de investigación para el mejoramiento animal, Estación internacional de trasplante de embriones Carlos Iglesias Oliva. 1988. Transferencia de embriones. Centro de información y documentación agropecuario; La Habana.
6. Centro latinoamericano de educación a distancia. 2000. Transferencia y criopreservación de embriones bovinos. CD-ROM; México.
7. Dalton J, et al. 2000. The effect of time of artificial inseminations on fertilization and embryo quality in superovulated cows. Animal Science 78: 2081-2085.
8. De la Fuente J, Fuentes S, Gutierrez A, et al. 1998. I Curso internacional de transferencia de embriones manuales y apéndices. INIA-RACRZ; Madrid.
9. Derivaux J, Ectors F. 1990. Fisiopatología de la gestación y obstetricia veterinaria. Acriba; Zaragoza.
10. Diamond M. 1998. Infertility and Reproductive Medicine. Saunders; Pennsylvania.
11. Dorn C, Kraemer D. 1986. Bovine Embryo Transfer. Texas veterinary medical center; Dallas.

12. Dorn C, Kraemer D. 1986. Non Surgical Bovine Embryo Collection Procedure. Texas veterinary medical center; Dallas.
13. Elsdon G. 1989. Embryo Transfer in Dairy Cattle. Colorado State University; Denver.
14. Hafez. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. Interamericana McGraw Hill; México D. F.
15. Lindsell C, Murpy B, Mapletoft RJ. 1986 Superovulatory and endocrine response in heifers treated with FSH at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*.26: 209-219.
16. Olson S, Seidel Jr. 2000. Reduced oxygen tension improve zygote development in chemically defined medium. *Animal Science* 78: 151-157.
17. Solomon E, Berg L, Martin D, Ville C. 1996. Biología de Villet. Interamericana McGraw Hill; México D.F.
18. Stevenson J, et al. 2000. Synchronizing estrus and ovulation in cows after combinations of GnRH, norgestomet, and prostaglandin with or without timed insemination. *Animal Science*78: 1746-1759.
19. Valencia I. 2002. Reproducción e infertilidad. Creativa; Quito.
20. Wilmut I, Campbell K, Tudge C. 2000. La Segunda creación. Grupo Z; Barcelona.

11. Tablas:

Tabla 1. Características del lactato de Ringer:

Compuesto y característica química	Concentración por cada 1000ml y valores químicos
NaCl	6g
KCl	0.3g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.2g
CH ₃ CHOHCOONa	3.1g
pH	7.0
Osmolaridad	275mOsm/litro

Tabla 2. Aplicación secuenciada e independiente de los tratamientos:

Código del animal	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
3	AT ¹	AT ¹	AT ¹	AT ¹
10	AT ¹	AT ¹	AT ¹	AT ¹
13	AT ¹	AT ¹	AT ¹	AT ¹
14	AT ¹	AT ¹	AT ¹	AT ¹
26	AT ¹	AT ¹	AT ¹	TNA ²
101	AT ¹	AT ¹	AT ¹	TNA ²
135	AT ¹	AT ¹	AT ¹	TNA ²
144	AT ¹	TNA ²	TNA ²	TNA ²
1	TNA ²	AT ¹	AT ¹	TNA ²
8	TNA ²	AT ¹	AT ¹	AT ¹
18	TNA ²	AT ¹	AT ¹	TNA ²

AT¹: aplicación del tratamiento.

TNA²: Tratamiento no aplicado.

Tabla 3. Características ováricas post tratamientos y durante la selección:

Selección de hembras y tratamientos	Número de animales	Porcentaje de cuerpos lúteos
Selección de animales	11	73%
Tratamiento 1	8	25%
Tratamiento 2	10	90%
Tratamiento 3	10	60%
Tratamiento 4	5	40%

Tabla 4. Monitorización del estro post 48 horas de cada tratamiento:

Tratamientos	Número de animales	Presencia de estro
Tratamiento 1	8	25%
Tratamiento 2	10	40%
Tratamiento 3	10	40%
Tratamiento 4	5	40%

Tabla 5. Tiempo transcurrido para la observación del estro:

Tratamientos	Media del tiempo transcurrido
Tratamiento 1	Post 96 horas.
Tratamiento 2	Post 60 horas.
Tratamiento 3	Post 60 horas.
Tratamiento 4	Post 60 horas.

Tabla 6. Palpación rectal post superovulación y número de embriones:

Código del animal donante	Cuerpos lúteos	Embriones
101	2	0
8	5	5

Tabla 7. Características de los embriones:

Variable analizada	Número del embrión				
	1	2	3	4	5
Estado de desarrollo	Blastocisto tardío	Blastocisto temprano	Blastocisto tardío	Blastocisto tardío	Blastocisto tardío
Zona pelúcida	Desprendida	Irregular	Rota	Rota	Adherida
Apariencia del citoplasma	No granuloso	No granuloso	No granuloso	No granuloso	No granuloso
Morfología de los blastómeros	Regulares en la forma y tamaño	Regulares en la forma y tamaño	Regulares en la forma y tamaño	Regulares en la forma y tamaño	Regulares en la forma y tamaño
Membranas celulares	Distensión y ausencia de rigidez	Distensión y ausencia de rigidez	Distensión y ausencia de rigidez	Distensión y ausencia de rigidez	Distensión y ausencia de rigidez

12.Figuras:

Figura 1. Gráfico del ciclo estral en *Bos taurus*:

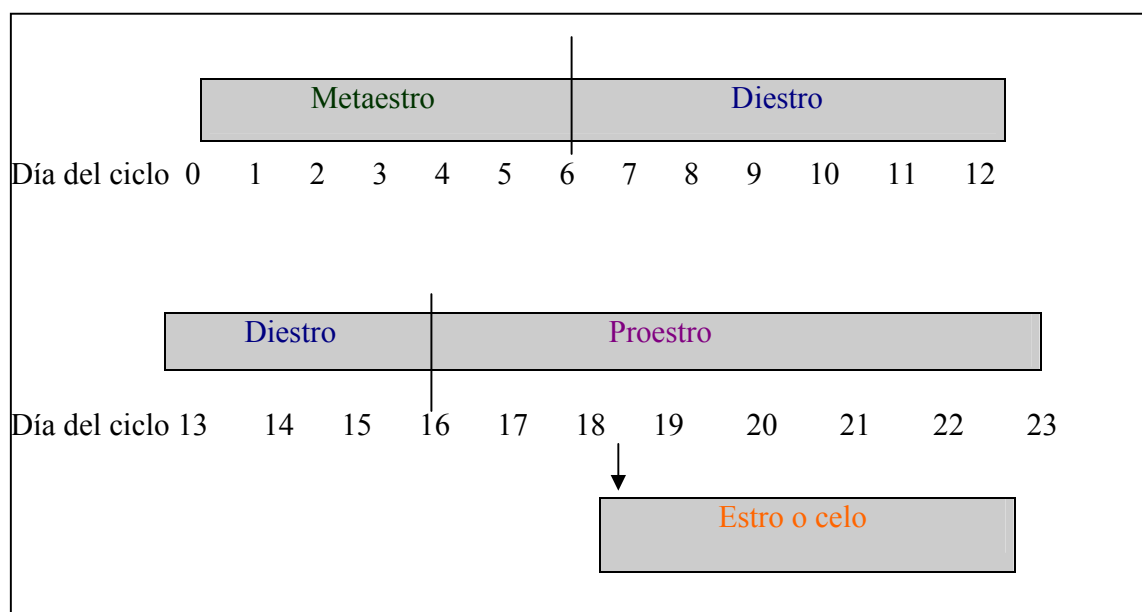


Figura 2. Gráfico de los Animales seleccionados para la superovulación:



a) hembra 101.



b) hembra 8.

Figura 3. Gráfico de la sincronización del estro con una dosis de $\text{PGF}2\alpha$:

H.A ¹					
		EC ³	PGF2 α ⁴	Detección estro	EC ³
		↓	↓	↓	↓
Día ²		0	1	3	8

H.A¹: Hormona aplicada

Día²: Especifica el día del tratamiento y toma a la primera exploración clínica como el día cero.

EC³: Exploración clínica.

PGF2 α ⁴: Prostaglandina F 2 α

Figura 4. Gráfico de la sincronización del celo a base de GnRH y PGF2 α :

H.A ¹	EC ³ + GnRH ⁵	EC ³	PGF2 α ⁴	Detección estro	EC ³
Día ²	0	13	18	20	28

H.A¹: Hormona aplicada

Día²: Especifica el día del tratamiento y toma a la primera exploración clínica como el día cero.

EC³: Exploración clínica.

PGF2 α ⁴: Prostaglandina F 2 α

GnRH⁵: Hormona liberadora de gonadotropinas.

Figura 5. Gráfico de la sincronización estral con dos dosis de PGF2 α :

H.A ¹	PGF2 α ³ + EC ⁴	PGF2 α ³	Detección estro	EC ⁴
Día ²	0	11	13	28

H.A¹: Hormona aplicada

Día²: Especifica el día del tratamiento y toma a la primera exploración clínica como el día cero.

PGF2 α ³: Prostaglandina F 2 α

EC⁴: Exploración clínica

Figura 6. Gráfico de la sincronización con progestágeno:

H.A ¹	Estrógeno + IP ² + EC ⁷	PGF2 α ⁵ + GnRH ⁶	-RP ³	Detección estro + EC ⁷
Día ⁴	0	9	10	11

H.A¹: Hormona aplicada

IP²: Implante de progestágeno.

RP³: Retiro del implante de progestágeno.

Día⁴: Especifica el día del tratamiento y toma a la primera exploración clínica como el día cero.

PGF2 α ⁵: Prostaglandina F 2 α

GnRH⁶: Hormona liberadora de gonadotropinas.

EC⁷: Exploración clínica

Figura 7. Gráfico de la superovulación e inseminación de la hembra 101:

H.A ¹	PGF2 α	Detección estro	(FSH*2) ³	(FSH*2) ³
Día ²	0	2	11	12
H.A ¹	(FSH*2) ³ + PGF2 α ⁵	(FSH*2) ³	Detección estro + IA ⁴	Colecta
Día ² .	13	14	15	22

H.A¹: Hormona aplicada.

Día²: Especifica el día del tratamiento y toma primera aplicación de prostaglandina como el día cero.

(FSH*2)³: Dos dosis de hormona foliculo estimulante con un intervalo de doce horas.

IA⁴: Inseminación artificial.

PGF2 α ⁵: Prostaglandina F 2 α

Figura 8. Gráfico de la superovulación e inseminación de la hembra 8:

H.A ¹	Estrógeno + IP ² + EC ⁶	FSH	(FSH*2) ⁵	(FSH*2) ⁵
Día ⁴	0	6	7	8
H.A ¹	(FSH*2) ⁵ + PGF2 α + GnRH		FSH - RP ³	Detección estro + IA ⁴
Día ⁴	9		10	11
H.A ¹	Colecta y evaluación de embriones			
Día ⁴	18			

H.A¹: Hormona aplicada

IP²: Implante de progestágeno.

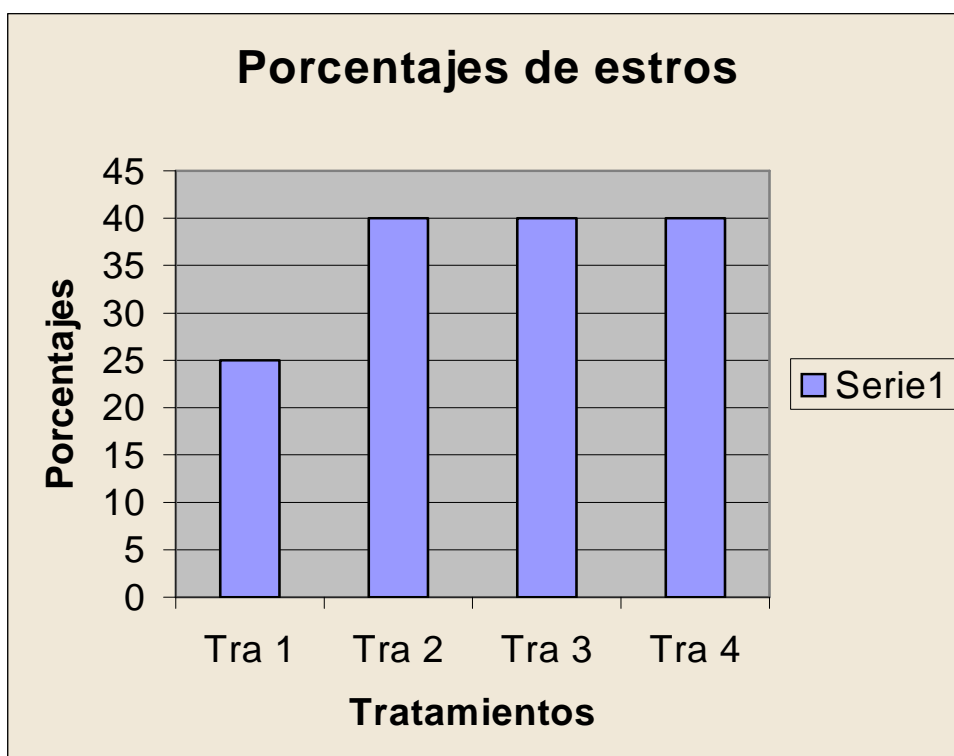
RP³: Retiro del implante de progestágeno.

Día⁴: Especifica el día del tratamiento y toma a la aplicación de progestágeno como el día cero.

(FSH*2)⁵: Dos dosis de hormona foliculos estimulante con un intervalo de doce horas.

EC⁶: Exploración clínica.

Figura 9. Gráfico de los porcentajes de estros post tratamientos:



Tra 1: Tratamiento a base de una sola dosis de $\text{PGF2}\alpha$.

Tra 2: Tratamiento a base de GnRH y $\text{PGF2}\alpha$.

Tra 3: Tratamiento a base de dos inyecciones de $\text{PGF2}\alpha$.

Tra 4: Tratamiento a base de progestágeno.

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Evaluación de la solución salina de Ringer como medio de colecta para
embriones de *Bos taurus* y sincronización estral en potenciales receptoras**

José Sebastián Robalino Espinosa

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de
Baccalaureus Scientiae especialización biotecnología

Quito

Noviembre de 2004

**Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias de la vida**

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Evaluación de la solución salina de Ringer como medio de colecta para
embriones de *Bos taurus* y sincronización estral en potenciales receptoras**

José Sebastián Robalino Espinosa

Marcelo Almeida , DVM, MSc.

Director de tesis

(firma)

Marcelo Almeida , DVM, MSc.

Miembro del comité de tesis

(firma)

Gabriel Trueba , DVM, PhD.

Miembro del comité de tesis

(firma)

María de Lourdes Torres, PhD.

Miembro del comité de tesis

(firma)

Hugo Valdebenito, PhD.

Decano del colegio de Ciencias de la Vida

(firma)

Quito, Noviembre de 2004

© Derechos de autor
José Sebastián Robalino Espinosa
2004

Dedicatoria

A la memoria de mis abuelos y seres queridos.

Agradecimientos

Este proyecto de investigación no habría nacido sin el alentador apoyo de Marcelo Almeida. También quiero agradecer a Gabriel Trueba y María de Lourdes Torres por la revisión del manuscrito y sus valiosos comentarios. Mi profundo reconocimiento a José y María Robalino por su cariñoso apoyo durante muchos años.

Abstracto

El propósito del presente proyecto fue evaluar el lactato de Ringer como medio de colecta de embriones y determinar la eficiencia de 4 tratamientos de sincronización estral. Para los objetivos mencionados, se trabajó con once hembras de la raza Holstein. Los animales que presentaron cuerpos lúteos se sometieron secuencialmente e independientemente a los 4 tratamientos de sincronización estral. En el primero (1) se usó una sola inyección de prostaglandina (PGF2 α). En el segundo (2) se inoculó dos inyecciones de PGF2 α , separadas por 11 días. En el tercero (3) se sincronizó la onda folicular con la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y seguidamente se empleó PGF2 α en fase luteal. En el cuarto (4) se prolongó la fase luteal con el uso de progestágenos. De las once hembras dos con códigos 6 y 10 fueron superovuladas, con dosis constantes de la hormona folículo estimulante (FSH). Posterior a lo cual, se inseminó y colectó embriones por lavado uterino con lactato de Ringer. No se recuperaron embriones de la hembra 6. En contraste, del animal 10 se obtuvieron 5 blastocistos con aparentes defectos en la zona pelúcida. Los tratamientos 2, 3 y 4 generaron 40% de estros; en tanto que el tratamiento 1 tuvo un 25% de eficiencia. Los porcentajes de cuerpos lúteos al finalizar cada uno de los tratamientos fueron de 25% en el tratamiento 1, 90% en el tratamiento 2, 60% en el tratamiento 3 y de 40% en el tratamiento 4. Los resultados del proyecto sugieren que el lactato de Ringer no es un medio ideal para colectar embriones bovinos. Los tratamientos 2, 3 y 4 fueron 15% más eficientes que el tratamiento 1. Adicionalmente, el tratamiento 2 generó más cuerpos lúteos que los tratamientos 1, 3 y 4.

Abstract

The purpose of the present project was to evaluate Ringer's lactate solution as a medium for collecting bovine embryos and to establish the efficiency of four estrus synchronization treatments. To obtain these objectives, eleven Holstein cows were used. The cows with *corpora lutea* were subjected to four different treatments of estrus synchronization. In the first one (1), a single injection of prostaglandin (PGF2 α) was used. In the second one (2), two injections of PGF2 α at 11 day interval were given. In the third one (3), the follicular state was synchronized by using a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) followed by PGF2 α . For the fourth one (4), progesterone was used to prolong the *corpora lutea*. Of eleven cows, two (with codes 6 and 10) were induced to superovulation. These cows were inseminated and embryos were collected using Ringer's lactate. From cow 6, no embryos were observed. From cow 8, five blastocysts were obtained. These embryos appeared to have damage in *zona pellucida*. Treatments 2, 3, and 4 generated 40% of estrus. Treatment 1 proved to be 25% efficient. The number of *corpora lutea* generated after treatments were: 25% in treatment 1, 90% in the treatment 2, 60% in the treatment 3 and 40% in the treatment 4. The results of this project suggest that Ringer's Lactate is not an ideal medium for bovine embryos collection. Treatments 2, 3, and 4 were 15% more efficient than treatment 1. Treatment 2 was the most effective in the generation of *corpora lutea*.

Tabla de Contenido

Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Abstracto.....	vi
Abstract.....	vii
Tabla de Contenido.....	viii
Lista de tablas y figuras.....	x
1. Introducción:.....	1
1.1 Fisiología reproductiva y embriología de <i>Bos taurus</i> :.....	1
1.1.1. Origen y mitosis de las células germinales:.....	1
1.1.2. Meiosis de los gametos femeninos:.....	1
1.1.3. Meiosis y maduración estructural de los espermatozoides:.....	1
1.1.4. Estadios foliculares y maduración estructural de los ovocitos:.....	2
1.1.5. Dinámica del desarrollo folicular:.....	3
1.1.5.1. Ondas de desarrollo folicular en <i>Bos taurus</i> :.....	3
1.1.6. Definición y duración del ciclo estral:.....	3
1.1.6.1. Animales cíclicos y acíclicos:.....	4
1.1.7. Regulación neuroendocrina de la ovulación y del ciclo estral:.....	4
1.1.8. Ovulación:.....	4
1.1.9. Transporte espermático:.....	5
1.1.10. Penetración de la <i>corona radiada</i> y del <i>cumulus oportus</i> :.....	5
1.1.11. Anclaje y penetración de la zona pelúcida:.....	5
1.1.12. Ingreso del espermatozoide en el ovocito secundario:.....	6
1.1.13. Activación del ovocito secundario:.....	6
1.1.14. Clivaje y morfología embrionaria:.....	6

1.1.15. El control del ciclo celular durante la segmentación embrionaria:	7
1.2. Reproducción asistida en <i>Bos taurus</i> :.....	8
1.2.1. Exploración clínica:.....	8
1.2.2. Selección de animales con fines reproductivos:.....	8
1.2.3. Definición y sistemática de la sincronización estral:	8
1.2.3.1. Tratamientos e índices de éxito en la sincronización estral:	9
1.2.4. Definición y metodología de la superovulación:	9
1.2.4.1. Índice de éxito en la superovulación:	10
1.2.5. Características del semen congelado:	10
1.2.5.1. Inseminación artificial con semen descongelado:	11
1.2.6. Colecta de embriones por gravedad en circuito cerrado:.....	11
1.2.7. Medios para la colecta de embriones bovinos:.....	11
1.2.7.1. El suero animal en el medio de colecta:	12
1.2.7.2. El lactato de Ringer como medio de colecta:	12
1.2.8. Evaluación de embriones:	13
3. Objetivos generales:.....	15
4. Objetivos específicos:.....	16
5. Área de estudio:.....	17
6. Materiales:	18
7. Métodos:.....	19
8. Resultados:.....	22
9. Discusión:	24
10. Referencias:.....	27
11. Tablas:	29
12. Figuras:.....	32

Lista de tablas y figuras

11.Tablas:	29
Tabla 1. Características del lactato de Ringer:	29
Tabla 2. Aplicación secuenciada e independiente de los tratamientos:.....	29
Tabla 3. Características ováricas post tratamientos y durante la selección:	30
Tabla 4. Monitorización del estro post 48 horas de cada tratamiento:	30
Tabla 5. Tiempo transcurrido para la observación del estro:	30
Tabla 6. Palpación rectal post superovulación y número de embriones:.....	30
Tabla 7. Características de los embriones:	31
12.Figuras:	32
Figura 1. Gráfico del ciclo estral en <i>Bos taurus</i> :	32
Figura 2. Gráfico de los Animales seleccionados para la superovulación:	32
Figura 3. Gráfico de la sincronización del estro con una dosis de PGF2 α :.....	33
Figura 5. Gráfico de la sincronización estral con dos dosis de PGF2 α :	34
Figura 7. Gráfico de la superovulación e inseminación de la hembra 6:.....	35
Figura 8. Gráfico de la superovulación e inseminación de la hembra 10:.....	36
Figura 9. Gráfico de los porcentajes de estros post tratamientos:	37

1. Introducción:

1.1 Fisiología reproductiva y embriología de *Bos taurus*:

1.1.1. Origen y mitosis de las células germinales:

Los precursores de los gametos femeninos y masculinos son los espermatogonios y oogonios; éstos durante el desarrollo embrionario tienen su origen en el epitelio intestinal, de donde migran hacia los primordios de las gónadas. La división celular difiere considerablemente entre los espermatogonios y oogonios. Los últimos merman su proliferación mitótica a causa del ingreso a profase I (PI) y de la apoptosis. En contraste a lo expuesto, la mitosis en los espermatogonios es constante y se realiza en el epitelio seminífero (Bruce, 2000; De la Fuente, 1998; Solomon, 1996).

1.1.2. Meiosis de los gametos femeninos:

La meiosis de los gametos femeninos incluye dos bloqueos secuenciales. Durante la etapa embrionaria los óvulos se constituyen en ovocitos primarios; éstos se encuentran paralizados en PI. En la pubertad algunos de los gametos femeninos se convierten en ovocitos secundarios, los cuales se encuentran en metafase II (MII), etapa que se interrumpe a causa de la fecundación (Bruce, 2000; Wilmut, 2000).

1.1.3. Meiosis y maduración estructural de los espermatozoides:

Los espermatogonios se encuentran en el epitelio seminífero y se dividen en dos clases. La primera se denomina A y representa a la población de células precursoras; las que por mitosis mantienen un número apropiado de espermatogonios. La segunda es clase B y se halla destinada a comenzar la meiosis; la cual en su primera etapa perdura aproximadamente por veinticuatro horas. En dicho período, los gametos masculinos se denominan primarios y producen ácido ribonucleico mensajero (ARNm) destinado, a la traducción de protaminas (Bruce, 2000; De la Fuente, 1998).

Después de la formación de los espermatoцитos primarios, se originan los gametos masculinos secundarios; éstos se encuentran en la segunda división meiótica, la cual una vez concluida permite el origen de gametos inmaduros denominados espermátides. Dichas células entran en espermiogénesis, proceso en el que se evidencia crecimiento flagelar, reducción del tamaño nuclear y condensación del aparato de Golgi. Al finalizar la espermiogénesis, los espermatozoides son transportados al epidídimo, en donde adquieren una capa de glucoproteínas (Bruce, 2000; De la Fuente, 1998).

1.1.4. Estadios foliculares y maduración estructural de los ovocitos:

Se denomina folículo al gameto femenino rodeado de una cubierta de células. El folículo primordial es el estado más inmaduro, se forma en la etapa embrionaria además está conformado por una capa células fusiformes de la granulosa y un ovocito primario. En la etapa neonatal el ovocito primario se encuentra rodeado, por dos capas de células cuboidales de la granulosa. Dicha estructura se denomina folículo primario y en él se desarrolla la *corona radiada* y la zona pelúcida. La última estructura posee receptores de espermatozoides especie específicos, previene la poliesperminación y promueve el movimiento del cigoto dentro del oviducto (Borrero, 1996; Bruce, 2000; Buxadé, 1995).

Posterior al origen del folículo primario se forman los siguientes estados el secundario, el terciario y de Graaf. El folículo secundario se constituye por la proliferación de la células de la granulosa. Dicha acción es mediada por la activina, proteína que forma parte de las moléculas de activación del factor β de transformación de crecimiento. En el folículo secundario el estroma se diferencia en la teca interna y externa. La teca interna es altamente vascularizada así como glandular. En tanto que, la teca externa es una cápsula exterior de tejido conectivo (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; Hafez, 1996).

El folículo terciario posee un espacio entre las células de la granulosa denominado antro; éste se encuentra lleno de líquido folicular, el cual contiene albúmina, hormona leutinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH) y proteoglicanos. El folículo de Graaf posee un antro, más grande que el del folículo terciario, y un ovocito en MII; éste se encuentra

rodeado por células de la granulosa, las cuales en conjunto se denominan *cumulus oortus* (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; Hafez, 1996).

1.1.5. Dinámica del desarrollo folicular:

El desarrollo folicular consta de tres eventos el reclutamiento, la selección y la dominancia. Las tres etapas mencionadas en conjunto se denominan onda folicular. El reclutamiento se divide en dos fases, la inicial, en la cual los folículos primarios crecen por factores intraováricos, y la cíclica, en la que se rescatan de la atresia a los folículos que poseen receptores para FSH. La selección es una acción parácrina, ejercida por el folículo dominante, para disminuir la respuesta a FSH de los folículos primordiales. Dicho proceso es facilitado, por la aparición de receptores de LH en las células de la teca interna y por la disminución de la concentración de FSH. La dominancia es la persistencia del folículo con escasa necesidad de FSH. Dicho evento es mediado por el factor promotor de la insulina (IGF), proteína que permite la persistencia del folículo dominante (Buxadé, 1995; Hafez, 1996).

1.1.5.1. Ondas de desarrollo folicular en *Bos taurus*:

El uso de ultrasonografía ha permitido evidenciar, que en *Bos taurus* existen tres ondas de desarrollo folicular. La primera comienza tres días después del estro y la selección del folículo dominante se presenta seis días después de la ovulación. La segunda se origina de ocho a nueve días post ovulación. La tercera se inicia después de once a doce días del celo y el folículo ovulatorio surge aproximadamente en el día 18 del ciclo estral (Buxadé, 1995; De la Fuente, 1998; Hafez, 1996).

1.1.6. Definición y duración del ciclo estral:

El intervalo de tiempo en cual comienza el celo se denomina ciclo estral, éste es poliéstrico continuo y tiene una duración de 18 a 23 días, dependiendo de las ondas de desarrollo folicular. El ciclo estral posee una fase de formación luteal o metaestro de seis días, un período luteal de 10 días denominado diestro y otro folicular de entre 2 a 7 días llamado

proestro (Figura 1). La ovulación se produce de 11 a 14 horas después del estro, el cual aparece por primera vez a los 11 meses de edad. Cada celo perdura de entre 14 a 15 horas; tiempo en el cual existe un evidenciado incremento en el libido sexual del animal (Buxadé, 2000; Derivaux; Dorn, 1986; Hafez, 1996).

1.1.6.1. Animales cíclicos y acíclicos:

Una vaca cíclica posee niveles séricos de más de 1ng/mL de progesterona, durante la etapa de diestro; además, presenta el celo en un período que oscila entre 18 a 23 días. Las hembras acíclicas por lo general no presentan cuerpos lúteos durante el diestro y son renuentes a los tratamientos de sincronización del celo (De la Fuente, 1998; Stevenson, 2000).

1.1.7. Regulación neuroendocrina de la ovulación y del ciclo estral:

En la pubertad el hipotálamo elabora la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); la cual induce en la adenohipófisis la secreción de FSH Y LH. La FSH insita la proliferación de las células de la granulosa, las que por procesos de aromatización de andrógenos producen estrógenos, los cuales son liberados al torrente sanguíneo con inhibina para disminuir la concentración de FSH y un aumentar los niveles de LH (De la Fuente, 1998; Dorn, 1986; Bruce, 2000; Buxadé, 1995).

Los estrógenos estimulan la liberación de prostaglandina F2 α (PGF2 α) desde el útero. En tanto que, la LH desencadena la ovulación, la cual disminuye la concentración de estrógenos y origina la aparición del cuerpo lúteo. Éste secreta progesterona, hormona que disminuye los niveles de LH y FSH. En animales no gestantes la PGF2 α involuciona el cuerpo lúteo, para la reanudación del ciclo estral (Dorn, 1986; Bruce, 2000; Buxadé, 1995; Hafez, 1996).

1.1.8. Ovulación:

Después de la descarga de LH el ovocito primario entra en MII y el flujo sanguíneo aumenta hacia el ovario. Dicha edematisación genera la liberación de prostaglandinas,

histamina y vasopresina. Dichos mediadores inflamatorios sirven como punto de partida para la producción de colagenasa, enzima que causa el debilitamiento de la pared folicular. Dicho evento, en conjunto con la presión líquido antral y las contracciones del tejido muscular, conducen a la expulsión del ovocito secundario (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; De la Fuente, 1998; Hafez, 1996).

1.1.9. Transporte espermático:

Los gametos masculinos que se han depositado en el tracto genital deben atravesar el cérvix, región que en su interior presenta moco cervical, el cual actúa como filtro de espermatozoides con motilidad progresiva lenta y oscilatoria. En el útero las células seminales son transportadas, por su propia movilidad y por las contracciones del músculo liso, hacia el istmo. En dicha región los espermatozoides se acumulan para entrar en un período de hiperactividad. En él se incrementa la motilidad progresiva rápida, lo cual permite que los gametos alcancen la ampolla (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; De la Fuente, 1998; Dorn, 1986; Wilmut, 2000).

1.1.10. Penetración de la *corona radiada* y del *cumulus oportus*:

Los espermatozoides que han llegado a la ampolla tubárica presentan alteración de las glucoproteínas superficiales, lo cual facilita el ingreso del gameto masculino en el ovocito secundario. Otro factor importante, que permite la penetración de la *corona radiada* y del *cumulus oportus*; es la emisión desde el acrosoma de la enzima hialuronidasa (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; De la Fuente, 1998).

1.1.11. Anclaje y penetración de la zona pelúcida:

La zona pelúcida consta de tres glucoproteínas ZP1, ZP2, y ZP3. Las dos primeras son estructurales y la tercera constituye, el receptor especie específico para proteínas localizadas sobre la cabeza espermática. La unión del gameto masculino con la zona pelúcida permite, el

ingreso de calcio y sodio así como la salida de iones hidrógeno. El flujo iónico mencionado facilita la liberación de acrosina, enzima que digiere las glucoproteínas ZP1 y ZP2 (De la Fuente, 1998; Bruce, 2000; Buxadé, 1995).

1.1.12. Ingreso del espermatozoide en el ovocito secundario:

Las microvellosidades de la membrana ovocitaria envuelven la cabeza del espermatozoide, para formar un cono de fecundación, el cual se contrae para la unión intergametal. Dicho evento es colaborado por la asociación de las moléculas de superficie del espermatozoide, con la integrina $\beta 1$ de la membrana plasmática del óvulo. Una vez que la cabeza espermática ha ingresado en el ovocito secundario, los canales iónicos se abren para permitir la entrada de sodio. El cual ocasiona un cambio en el potencial de reposo desde -70 mV a $+10$ mV. La despolarización celular evita la entrada de varios espermatozoides en el ovocito secundario, a lo cual también colabora la reacción cortical. Ésta comienza con un incremento citoplasmático de la concentración del calcio; ion que promueve la liberación de enzimas para la destrucción de la glucoproteína ZP3 (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; Dorn, 1986; Wilmut, 2000).

1.1.13. Activación del ovocito secundario:

La activación del ovocito secundario se produce después de la fecundación e involucra dos procesos, la culminación de la meiosis y el inicio de la segmentación celular. Al finalizar la meiosis se restablece la membrana nuclear y se expulsa el segundo cuerpo polar. En el inicio del clivaje embrionario los pronúcleos entran en la fase S y posteriormente se integran, en la etapa bicelular del embrión (Bruce, 2000; Buxadé, 1995; Wilmut, 2000).

1.1.14. Clivaje y morfología embrionaria:

La segmentación forma después de 5 a 6 días de la fecundación, un agregado celular denominado mórula. Dicha estructura tiene dos estados un temprano y un tardío. Los blastómeros de la mórula tardía bombean sodio al interior del embrión, para construir el blastocele. Está cavidad con las células embrionarias que la rodean se denominan en conjunto

blastocisto. En dicha estructura los blastómeros se diferencian en el trofoectodermo, que da origen a la placenta, y en la masa celular interna (MCI), la cual se constituye en el primordio de las capas embrionarias. El blastocisto tiene algunos estados:

- Blastocisto temprano: Se presenta de 6 a 7 días post fecundación y tiene un blastocele pequeño.
- Blastocisto tardío: Se genera los 7 o 8 días de la fecundación y en su morfología se distingue un blastocele amplio.
- Blastocisto expandido: Se origina a los 8 o 9 días de la fecundación y en él se puede apreciar un blastocele muy amplio.
- Blastocisto eclosionado: Se presenta a los 9 o 10 días de la fecundación y el embrión no se encuentra rodeado por la zona pelúcida.
- Blastocisto eclosionado expandido: Se origina a los 10 o 11 días de la fecundación y el blastocele se encuentra muy expandido (Bruce, 2000; De la Fuente, 1998; Dorn 1986; Wilmut, 2000).

1.1.15. El control del ciclo celular durante la segmentación embrionaria:

El ciclo celular durante la segmentación embrionaria está controlado por factores procedentes del citoplasma, entre los cuales están los que inducen a la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Éstos se denominan factores permisivos y se ponen en contacto con el material genético al final de la profase, que es cuando la membrana nuclear desaparece, a causa del factor promotor de la maduración (MPF). Dicho complejo proteínico induce la condensación de los cromosomas y estimula la formación del huso mitótico (Bruce, 1996; Wilmut, 2000).

El MPF disminuye al término de la mitosis para la restauración de la membrana nuclear y para que los factores permisivos permanezcan en el interior del núcleo celular. El MPF es un complejo integrado por cinasas, como la proteína ciclo de división celular 2 (CDC2) y la ciclina B. En el transcurso del ciclo celular la CDC2 se mantiene en niveles constantes. En contraste a lo mencionado, la concentración es mayor en la etapa de mitosis

para la ciclina B. La cual es estabilizada por el factor de control de sistema (CSF); él que es afianzado solo en la ausencia de calcio iónico (Bruce, 1996; Wilmut, 2000).

1.2. Reproducción asistida en *Bos taurus*:

1.2.1. Exploración clínica:

El estudio de las hembras que participan de un programa de reproducción asistida, conlleva el análisis de síntomas y signos que son indicativos del estado reproductivo de los animales. El celo es un síntoma que frecuentemente es monitorizado, para lo cual es importante notar si hay un cambio en el libido sexual, éste se expresa de forma visible por la monta entre hembras bovinas. Los signos que habitualmente se estudian son el estado ovárico y el estado de gestación. En dichos casos se utiliza la palpación rectal, técnica en la que se introducen en el recto la mano y el brazo para percibir folículos, cuerpos lúteos y membranas fetales. Las últimas estructuras indican, que los animales atraviesan por un proceso de gestación. Durante la palpación rectal, los folículos se perciben como elevaciones blandas y los cuerpos lúteos se distinguen por su forma globosa, que los separa del cuerpo ovárico (Derivaux, 1990).

1.2.2. Selección de animales con fines reproductivos:

Los animales que se seleccionan con fines reproductivos deben presentar de preferencia partos anteriores registrados, regularidad en el ciclo estral, ausencia de gestación y buen estado sanitario. Adicionalmente, las hembras donantes deben poseer, una producción láctea superior a la media del rebaño (Dorn, 1986; Hafez, 1996; Lindsell, 1986).

1.2.3. Definición y sistemática de la sincronización estral:

La sincronización del ciclo estral es la regulación del celo en grupo de hembras. Dicho objetivo es cumplido con el uso de hormonas reproductivas, que posterior a su uso permiten el advenimiento del estro en un tiempo homogéneo. La metodología incluye dos opciones, la primera utiliza PGF2 α , para generar la involución del cuerpo lúteo, y la segunda prolonga, la

fase luteal con el uso de progestágenos. El momento ideal para aplicar un tratamiento de sincronización, se encuentra relacionado con la etapa del ciclo estral. Es aconsejable que las hembras presenten cuerpos lúteos cuando se decide aplicar PGF2 α y estrógenos. De no presentarse la condición mencionada, se recomienda acelerar la dinámica del desarrollo folicular con el uso de GnRH, hormona que evita la prolongación del proestro (Centro latinoamericano de educación a distancia, 2000; De la Fuente, 1998; Dorn, 1986; Hafez, 1996).

1.2.3.1. Tratamientos e índices de éxito en la sincronización estral:

La mayoría de los tratamientos utilizados hacen uso de PGF2 α , estrógenos, GnRH y progestágenos. Dichas hormonas son administradas basándose en el estado ovárico y en el diseño de los tratamientos. Actualmente existen varios tratamientos, dentro de los cuales cuatro han tenido gran difusión. El primero aplica en fase luteal una sola inyección de PGF2 α y tiene, aproximadamente un éxito del 50% en vacas cíclicas. El segundo administra dos inyecciones de PGF2 α separadas por 11 días y origina, el celo en un 29% en los animales acíclicos y en un 72% en las hembras cíclicas (Stevenson, 2000; De la Fuente, 1998).

El tercer tratamiento emplea GnRH en fase folicular o luteal seguido, a los 6 o 7 días de PGF2 α . Los resultados del tratamiento mencionado tienen un éxito aproximado del 85% en vacas cíclicas y del 41% en hembras acíclicas. La cuarta metodología usa en fase luteal estrógeno e implantes de progestágeno. Después de 9 días de lo mencionado se aplica GnRH más PGF2 α y el implante de progesterona es retirado en el día 10. La eficiencia del último tratamiento mencionado se encuentra en estudio (De la Fuente, 1998; Stevenson, 2000).

1.2.4. Definición y metodología de la superovulación:

La superovulación es la generación del crecimiento folicular múltiple y se obtiene con el uso de hormonas gonadotrópicas. Los tratamientos superovulatorios deben realizarse entre los días 8 a 12 del ciclo estral, siendo de éstos el 9 el más propicio, porque en éste comienza la segunda onda de desarrollo folicular. Los tratamientos incluyen el uso de extractos de

pituitaria FSH, gonadotropina coriónica equina (PMSG) y FSH recombinante (FSHr). Los extractos de pituitaria FSH tienen una baja vida media en el plasma; por lo que, se aplican en 8 dosis constantes o decrecientes con intervalos de 12 horas. La PMSG, por persistir más de 10 días en el sistema circulatorio, se administra en una sola dosis seguida de PMSG neutra. La FSHr actualmente se encuentra en estudio, pero su uso podría ser prometedor, tomando en cuenta la gran pureza de los productos a base de ácido desoxirribonucleico recombinante (ADNr) (De la Fuente, 1998).

1.2.4.1. Índice de éxito en la superovulación:

La eficiencia del tratamiento superovulatorio puede medirse por el número de cuerpos lúteos o por la cantidad de embriones colectados post inseminación. El éxito de la superovulación depende de la dinámica folicular, del estado endocrino y de los factores genéticos. Dichas variables determinan que la respuesta superovulatoria sea muy variable. Sin embargo, aproximadamente en el 54% de los casos, de cada donante se puede recuperar 6 embriones (De la Fuente, 1998; Elsdén, 1989).

1.2.5. Características del semen congelado:

El semen previa congelación pasa por un proceso de evaluación, en el cual se analizan la morfología, la concentración y la motilidad espermática. Dichas variables deben presentar o superar los siguientes valores 70% de morfología normal y 60% de motilidad progresiva rápida. La concentración espermática posterior a la criopreservación, así como los diluyentes empleados en la congelación, pueden variar y su valor o clase dependen de la concentración espermática del eyaculado y de la compañía biotecnológica (De la Fuente, 1998).

Algunos de los diluyentes empleados para la criopreservación son Andromed, Triladyl y Biladyl (Minitub; Alemania). En todo caso, la mayoría de las soluciones ofrecen un aporte adecuado de energía, crioprotectores, buffers, antibióticos y electrolitos. El semen diluido es almacenado en tanques de nitrógeno líquido, a temperaturas que van desde -192 a -196 °C. Dichos valores son dependientes del grado de pureza del nitrógeno (De la Fuente, 1998).

1.2.5.1. Inseminación artificial con semen descongelado:

La inseminación artificial es el depósito de semen en el aparato genital de la hembra. La metodología se basa en el descongelamiento del semen en baño maría, seguido de la inoculación seminal. Dicha operación generalmente se realiza 12 horas después del estro o 48 post PGF2 α . El instrumental apropiado para realizar la inseminación incluye una pistola y una sonda transvaginal. Dichos instrumentos son guiados mediante palpación rectal, con el objetivo de liberar los gametos masculinos en la parte anterior del cérvix (Centro latinoamericano de educación a distancia, 2000; Dorn, 1986; Hafez, 1996).

1.2.6. Colecta de embriones por gravedad en circuito cerrado:

La recuperación de embriones por gravedad en circuito cerrado es una técnica no quirúrgica, que permite la extracción de embriones desde los oviductos. La técnica se realiza de 7 a 8 días post inseminación y se basa en el lavado de los cuernos uterinos, con el medio de colecta. El instrumental para la de recuperación de embriones bovinos incluye un filtro embrionario y un catéter Foley, de dos vías con balón inflable. La sonda Foley mediante palpación rectal es introducida a uno de los dos cuernos uterinos. En dicha región el balón es inflado, con el objetivo generar una cámara hermética, que pueda retener al medio de colecta. Dicha solución corre por gravedad desde el cuerno uterino hacia el filtro embrionario, en donde los embriones son retenidos (De la Fuente, 1998; Dorn, 1986; Hafez, 1996).

1.2.7. Medios para la colecta de embriones bovinos:

Los medios para la recuperación de embriones tienen por objetivo permitir el metabolismo embrionario. La solución que actualmente se utiliza para la colecta de embriones bovinos es el Dulbecco y se encuentra constituida por buffers de base fosfato, sales de cloro, piruvato, glucosa además es suplementado con 1 a 2% de suero inactivado fetal bovino o de ternero recién nacido. Otros medios que se podrían utilizar para la colecta de embriones son el TCM-199, HAM F-10, lactato de Ringer y MEM; éstos al igual que el Dulbecco se pueden suplementar con suero (De la Fuente, 1998).

1.2.7.1. El suero animal en el medio de colecta:

El suero se usa en el medio de colecta porque funciona como antioxidante. Sin embargo, tiene un alto índice de contaminación biológica, es de composición variable y está asociado a una excesiva producción de lactato, a lo cual puede estar vinculado algún tipo de daño mitocondrial. Actualmente se pretende reemplazar el suero animal con el uso de agentes quelantes, suero sintético y albúmina. El desarrollo de embriones de *Bos taurus* en medios carentes de suero animal, ha llegado hasta la etapa de blastocisto eclosionado, partiendo desde el estado de cigoto (Calderón, 1998; Diamond, 1998; Olson, 2000).

1.2.7.2. El lactato de Ringer como medio de colecta:

La solución salina de Ringer posee lactato, sales de calcio y cloro. El calcio podría inhibir el CSF, permitiendo que la mitosis se produzca con una frecuencia homóloga al desarrollo embrionario *in situ*. El lactato funciona como fuente energética. Los valores de los factores químicos y físicos son pH de 7.0 y osmolaridad de entre 270 a 300 mOsm/L (Tabla 1) (Ahumada, 1998; Borrero, 1996; De la Fuente, 1998; Dorn, 1986; Hafez, 1996).

1.2.8. Evaluación de embriones:

La evaluación embrionaria tiene como propósito eliminar los embriones de mala calidad. Para lograr dicho objetivo se analizan las siguientes variables:

- Estado de desarrollo: La morfología embrionaria debe estar de acuerdo con el día de colecta; tomando como referencia la fecha de la inseminación.
- Apariencia de la zona pelúcida: Deben estar ausentes de la zona pelúcida los fragmentos y las rupturas.
- Morfología de los blastómeros: Las células embrionarias deben ser regulares en el tamaño y la forma.
- Características de las membranas celulares: La distensión y la ausencia de rigidez son indicativos del buen estado de las membranas.
- Apariencia del citoplasma: El citosol de los blastómeros no debe ser granuloso (Ahumada, 1998; Borrero, 1996).

2. Justificación:

La utilización de suero animal en los medios para embriones, es un remanente del cultivo de células eucarióticas diploides. Cultivando *in vitro* embriones, de ratones, bovinos, humanos y porcinos en soluciones salinas, se a descubierto que el suero no es imprescindible para el desarrollo embrionario. Los embriones bovinos actualmente se recuperan con la solución de Dulbelco; ésta se suplementa con suero, el cual podría absorber los factores de crecimiento del fluido de los oviductos, reduciendo así la tasa de implantación. Por lo tanto, es indispensable conocer si el suero es un requisito indispensable, durante la fase de preimplantación embrionaria bovina. Dicho objetivo, se puede cumplir recuperando embriones con medios salinos carentes de suero como el lactato de Ringer.

Por otra parte, actualmente se utilizan combinaciones de $PGF2\alpha$, estrógenos, progesterona y GnRH para la sincronización estral. Los diseños de los tratamientos a base de las hormonas mencionadas tienen porcentajes de éxito no homólogos. Por lo tanto, las diferencias en la etapa del ciclo estral entre los animales donantes y receptores, son considerables. Dicho factor afecta la implantación embrionaria, variable que es dependiente al estado endocrino de las hembras que participan de la transferencia de embriones. Por lo expuesto, es indispensable determinar cuáles son los tratamientos de sincronización estral más idóneos.

Si bien en el Ecuador no se realiza masivamente la transferencia de embriones, la utilización esporádica de dicha técnica, se lleva a cavo usando medios salinos para la colecta y tratamientos de sincronización estral que no son los más idóneos. Por lo expuesto, es indispensable determinar si la solución salina de Ringer es un medio eficaz para la recuperación de embriones y evaluar cual es el tratamiento de sincronización estral más eficiente. Dichos objetivos podrían ayudar a innovar la técnica de transferencia de embriones bovinos en el Ecuador.

3. Objetivos generales:

- Evaluar la solución salina de Ringer como medio de colecta de embriones bovinos.
- Establecer el mejor tratamiento de sincronización estral, dentro de los usados en este proyecto.

4. Objetivos específicos:

- Determinar el tiempo requerido para la aparición del estro, posterior a la aplicación de cada uno de los tratamientos de sincronización estral.
- Establecer el porcentaje de cuerpos lúteos, posterior a la finalización de cada uno de los tratamientos de sincronización estral.
- Determinar si los embriones recuperados se encuentran en el estado de desarrollo idóneo, para el día de la colecta.
- Evaluar en los embriones la zona pelúcida, las membranas celulares, la morfología y el citoplasma de los blastómeros.

5. Área de estudio:

El área en la que se realizó el estudio fue la hacienda Cuandina ubicada en la parroquia Amaguaña y el laboratorio Genteclab ubicado en la urbanización los Ángeles, San Rafael.

6. Materiales:

Hormonas:

- Estrógeno (Crestar, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda).
- FSH (Folltropin-V, Bioniche; Ontario Canadá).
- GnRH (Fertagyl, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda).
- Implantes de progestágeno (Crestar, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda).
- PGF2 α . (Iliren, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda).
- PGF2 α (Lutalyse, Pharmacia and Upjohn Co; Kalamazoo, MI, USA).

Insumos principales:

- Cajas petri de evaluación embrionaria (Minitub; Alemania).
- Catéter Foley de 2 Vías (Minitub; Alemania).
- Catéteres de inseminación (Minitub; Alemania).
- Copa y filtro embrionario (EMCON, Minitub; Alemania).
- Esteriomicroscopio.
- Lidocaína al 2%.
- Pajuelas seminales (Sersia; Alemania).
- Pistola de inseminación 0.5ml (Minitub; Alemania).
- Solución salina de Ringer (LIFE; Ecuador).

7. Métodos:

7.1. Selección de animales:

Para la sincronización estral, se seleccionaron once hembras Holstein con ausencia de gestación y regularidad en el ciclo estral. Dichas variables se analizaron por palpación rectal; ésta se efectuó con guantes ginecológicos e introduciendo la mano en el recto de los animales. Para la superovulación, se eligieron de los once animales dos con códigos 6 y 10 (Figura 2 a y b); éstos tenían la edad de 8 y 9 años respectivamente, antecedentes previos de parto y una producción láctea superior a la media del rebaño.

7.2. Sincronización estral:

Se utilizaron cuatro tratamientos de sincronización estral. El primero (1) se basó en la aplicación de 2.5ml de PGF2 α (Iliren, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda) (Figura 3). En el segundo (2) se sincronizó la onda folicular con 2.5ml GnRH (Fertagyl, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda), y después de 18 días se aplicó de 2.5ml PGF2 α (Lutalyse, Pharmacia and Upjohn Co; Kalamazoo, MI, USA) (figura 4). El tercero (3) consistió en la utilización de dos dosis de 5ml PGF2 α (Iliren, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda) separadas por 11 días (Figura 5). El cuarto (4) se basó en la inoculación de un implante de progestágeno (Crestar, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda) más 2ml de estrógeno (Crestar, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda); seguido después de 9 días de una inyección de 5ml de PGF2 α (Iliren Intervet international B. V; Boxmeer Holanda) y 2ml de GnRH (Fertagyl, Intervet international B. V; Boxmeer Holanda). El implante de progestágeno fue retirado en el día 10 (Figura 6).

Los 4 tratamientos se aplicaron secuencialmente, independientemente y sólo en los animales que poseían cuerpos lúteos. Dicha característica ovárica fue dilucidada mediante palpación rectal, técnica que se realizó al inicio y a la finalización de cada uno de los tratamientos para la sincronización estral (Figuras 3, 4, 5 y 6). Para la aplicación secuenciada de los tratamientos se usaron 8 animales en el tratamiento 1, 7 hembras para el tratamiento 2, 7

vacas para el tratamiento 3 y 4 animales para el tratamiento 4. Adicionalmente, se aplicó el tratamiento 2 en 3 animales, el tratamiento 3 en 3 vacas y el tratamiento 4 en una hembra (Tabla 2).

7.3. Monitorización estral:

Después de 48 horas de cada uno de los tratamientos se monitoreo visualmente el líbido sexual de los animales (Figuras 3, 4, 5 y 6). Para lo dicho, se realizaron observaciones durante 96 horas en intervalos de 360 minutos.

7.4. Superovulación:

La superovulación en las hembras 6 y 10 se realizó con dosis constantes de FSH (Folltropin-V, Bioniche; Ontario Canadá). Éstas se aplicaron en ocho inyecciones de 2.5ml con intervalos de doce horas. La hembra 6 fue superovulada en el transcurso del tratamiento 3. El animal 10 fue superovulado durante la aplicación del tratamiento 4 (Figuras 7 y 8).

7.5. Inseminación artificial:

Después de 48 horas del tratamiento 3 el animal 6 fue inseminado. Para lo dicho se utilizaron tres dosis seminales; las cuales fueron aplicadas en intervalos de doce horas (Figura 7). Después de dos días del tratamiento 4 la hembra con código 10 se inseminó, dos veces en intervalos de 12 horas (Figura 8). Las pajuelas seminales (Sersia; Alemania) que se usaron eran de 0.5ml con 80% de espermatozoides normales, 80% motilidad progresiva rápida y 20 millones de gametos masculinos por mililitro. Para cada una de las inseminaciones, las pajuelas se descongelaron a 35 °C por 45 segundos y se cargaron en la pistola de inseminación (Minitub; Alemania). Este último instrumento fue introducido en el tracto genital con un catéter (Minitub; Alemania), con el objetivo de liberar los gametos masculinos en la parte anterior del cérvix.

7.6. Colecta de embriones:

Previa a la recuperación de embriones en las hembras 6 y 10 se estimó por palpación rectal el número de cuerpos lúteos. Posteriormente en cada animal se realizó la anestesia epidural con 5ml de lidocaína al 2%. La colecta de embriones se efectuó, 7 días después de la última inseminación (Figuras 7 y 8), con la técnica de gravedad en circuito cerrado. En la realización de esta última técnica, mediante palpación rectal se introdujo el catéter Foley (Minitub; Alemania) al cuerno uterino. En dicha región el balón de la sonda fue inflado. Seguidamente se unió al catéter Foley, el filtro embrionario y el recipiente con lactato de Ringer (LIFE; Ecuador) a 37°C. Se permitió la entrada del medio de colecta al cuerno uterino, el cual fue masajeadado. Inmediatamente, se abrió la llave de salida para la evacuación del medio de colecta, el cual se dirigió hacia el filtro embrionario. Finalmente, el balón del catéter fue desinflado y la sonda Foley retirada del lumen uterino.

7.7. Búsqueda y evaluación embrionaria:

La búsqueda y evaluación embrionaria se realizó bajo esteriomicroscopio (20X). Los embriones encontrados permanecieron, en el lactato de Ringer por aproximadamente 15 minutos y fueron evaluados por el estado de desarrollo, apariencia de la zona pelúcida, morfología de los blastómeros, aspecto del citoplasma y por las características de las membranas de las celulares.

8. Resultados:

8.1. Características ováricas post tratamientos de sincronización estral:

Los porcentajes de formación de cuerpos lúteos no fueron semejantes después de la aplicación de cada uno de los tratamientos para sincronización estral. El tratamiento 2 fue el más eficaz para la formación de cuerpos lúteos. El tratamiento 3 fue 30% menos eficiente que el tratamiento 2, él cual generó 20% más de cuerpos lúteos que el tratamiento 4, éste formó 15% más de cuerpos lúteos que el tratamiento 1 (Tabla 3).

8.2. Monitorización estral post 48 horas de cada tratamiento:

Los porcentajes de síntomas de estro fueron semejantes, después de la aplicación de cada uno de los tratamientos para la sincronización estral. Los tratamientos 2, 3 y 4 tuvieron la misma eficiencia y generaron 15% más de celos que el tratamiento 1. Él cual tuvo un 25% de eficacia (Tabla 4).

8.3. Períodos de tiempo transcurridos para la observación del estro:

El tiempo transcurrido para la apreciación de síntomas de celo fue semejante posterior a la aplicación de cada uno de los tratamientos. Los tratamientos 2, 3 y 4 generaron el estro 36 horas antes que el tratamiento 1; él cual indujo el celo después de 96 horas de su aplicación (Tabla 5).

8.4. Características ováricas y número de embriones colectados:

Los porcentajes, de cuerpos lúteos posterior a la superovulación y el número de embriones colectados después de la inseminación, fueron variables entre las hembras donantes. La hembra 10 generó 40% más de cuerpos lúteos que el animal 6. No se observaron embriones en el medio de colecta proveniente de la hembra 10. Se recuperaron 5 blastocistos del animal 6 (Tabla 6).

8.5. Características de los embriones:

Los 5 embriones provenientes de la hembra 6 tenían características semejantes e imperfecciones en la zona pelúcida. Éstas incluyen desprendimiento, rupturas, adherencias e irregularidades. Los embriones se encontraban en el estado de blastocisto tardío y poseían citoplasmas no granulosos, blastómeros regulares y distensión en las membranas celulares (Tabla 7).

9. Discusión:

De la hembra número 10 se recuperaron 5 blastocistos, con aparentes defectos en la zona pelúcida. Dichas fallas no son frecuentes según Olson et al. 2000, quienes cultivaron embriones en medios salinos libres de suero y con antioxidantes, desde el estado de cigoto hasta la fase de blastocisto expandido. Las glucoproteínas pudieron verse afectadas, de acuerdo con el trabajo de Moor et al. 1984, por la genética, la edad, el estado nutricional y la fisiología del animal. Dichos factores determinan de acuerdo con la investigación de Looney et al. 1986, que en el 24% de los casos las donantes produzcan embriones en mal estado y que en el 64% de las superovulaciones, las hembras oferentes elaboren embriones de buena y mala calidad. La hembra 10 fue superovulada durante el tratamiento 4, el cual hizo uso de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), progesterona, prostaglandina F₂α (PGF₂α) y estrógenos. Dichas hormonas conforme a la investigación de Savage et al. 1987, pueden provocar ovulaciones en momentos inapropiados, generando así embriones de mala calidad (De la Fuente, 1998; Diamond, 1998; Hafez, 1996; Olson, 2000).

No se observó embriones en el medio de colecta proveniente de la vaca 6. Según el trabajo de Elsdén et al. 1986, cada animal se debería recuperar 6 embriones. Por lo tanto, en el animal 6 la respuesta superovulatoria no fue ideal. Dicha condición de acuerdo con la investigación de Lindsell et al. 1986, puede deberse al momento del tratamiento con relación al ciclo estral y a la presencia de un folículo dominante, el cual puede provocar atresia folicular. Además, es probable que la hembra 6 haya poseído folículos en proceso de atresia. Dicha condición, conforme al estudio de Monniaux et al. 1983, disminuye la respuesta a los tratamientos superovulatorios (De la Fuente, 1998; Elsdén, 1989).

El tratamiento 1 (una inyección de PGF₂α) tuvo un éxito del 25%; en tanto que los tratamientos 2 (una inyección de GnRH seguida después de 18 días de la aplicación de PGF₂α), 3 (dos inyecciones de PGF₂α separadas por 11 días) y 4 (prolongación de la fase luteal con el uso de progestágenos) obtuvieron un 40% (Figura 9). Dichas cifras son mayores a la tasa espontánea de celo, la cual según Stevenson et al. 2000 es del 16%. El tratamiento 3 fue 15% más eficiente que el número 1. Este resultado puede deberse a que después de la segunda

aplicación de PGF2 α del tratamiento 3, los animales se encontraban entre los días 8 y 17 del ciclo estral. Dicho período de tiempo de acuerdo con De la Fuente et al. 1998, es óptimo para la aplicación de las prostaglandinas. El tratamiento 1 fue 15% menos eficiente que el número 2. Dicho resultado puede deberse a la aplicación de GnRH en el tratamiento 2; dicha hormona según Hafez et al. 1996, predispone la formación de cuerpo lúteo. Éstos según Stevenson et al. 2000, son necesarios al momento de sincronizar el estro con PGF2 α (De la Fuente, 1998; Hafez, 1996; Stevenson, 2000).

Los tratamientos 2, 3 y 4 tuvieron una eficiencia del 40%. A pesar de esta semejanza, la formación de cuerpos lúteos fue diferente, 90% posterior a la aplicación del tratamiento 2 y 60% después del tratamiento 3. De acuerdo con Stevenson et al. 2000, un tratamiento de sincronización estral es mejor cuando posterior a su aplicación, permite la formación de cuerpos lúteos. Por lo tanto, el tratamiento número 2 fue superior al tratamiento 3 y 4. Es probable, que dicho resultado se deba a que previa aplicación de PGF2 α , en el tratamiento 2 se usó GnRH. Dicha hormona según Carlson et al. 2000, facilita la formación de cuerpos lúteos y genera de esta manera la condición ideal para la aplicación de PGF2 α (Carlson 2000; Stevenson, 2000).

Los animales mostraron síntomas de celo a las 60 horas de haber aplicado los tratamientos 2, 3 y 4. Dicho resultado coincide con De la Fuente et al. 1999, quien sostiene que el estro debe presentarse de 60 a 72 horas, después de haber aplicado algún tipo de tratamiento para la sincronización estral. En contraposición a los resultados de los tratamientos 2, 3 y 4, el estro se presentó después de 96 horas de la utilización de tratamiento 1. Este resultado según Iglesias et al. 1979, puede deberse al momento del ciclo estral, en el cual fueron aplicadas las prostaglandinas (De la Fuente, 1998; Diamond, 1998; Hafez, 1996; Olson, 2000).

Si bien los resultados del proyecto son insuficientes para llegar a una conclusión; los datos obtenidos sugieren que el lactato de Ringer no es un medio ideal para la colecta de embriones bovinos, que el tratamiento número 2 forma más cuerpos lúteos que los tratamientos 1, 3 y 4; que los tratamientos 2, 3 y 4 consiguen un 15% más de celos visibles que el tratamiento 1; y que los tratamientos 2, 3 y 4 generan el celo 48 horas antes que el

tratamiento 1. Por lo expuesto, se debería experimentar con más medios para la recuperación embrionaria desde los oviductos y cuando se realicen transferencias embrionarias el tratamiento, para la sincronización estral entre donante y receptoras, que se debería usar es el número dos.

10. Referencias:

1. Ahumada A, Sepúlveda S. 1998. Manual de procedimientos de reproducción asistida. Red latinoamericana de reproducción asistida; Santiago de Chile.
2. Borrero C, Sepúlveda S. 1996. Primer taller de criopreservación de embriones. Red latinoamericana de reproducción asistida; Santiago de Chile.
3. Buxadé C. 1995. Zootecnia bases de la reproducción animal. Mundi prensa; Madrid.
4. Carlson B. 2000. Embriología y biología del desarrollo. Harcourt; Madrid.
5. Centro de investigación para el mejoramiento animal, Estación internacional de trasplante de embriones Carlos Iglesias Oliva. 1988. Transferencia de embriones. Centro de información y documentación agropecuario; La Habana.
6. Centro latinoamericano de educación a distancia. 2000. Transferencia y criopreservación de embriones bovinos. CD-ROM; México.
7. Dalton J, et al. 2000. The effect of time of artificial inseminations on fertilization and embryo quality in superovulated cows. Animal Science 78: 2081-2085.
8. De la Fuente J, Fuentes S, Gutierrez A, et al. 1998. I Curso internacional de transferencia de embriones manuales y apéndices. INIA-RACRZ; Madrid.
9. Derivaux J, Ectors F. 1990. Fisiopatología de la gestación y obstetricia veterinaria. Acriba; Zaragoza.
10. Diamond M. 1998. Infertility and Reproductive Medicine. Saunders; Pennsylvania.
11. Dorn C, Kraemer D. 1986. Bovine Embryo Transfer. Texas veterinary medical center; Dallas.

12. Dorn C, Kraemer D. 1986. Non Surgical Bovine Embryo Collection Procedure. Texas veterinary medical center; Dallas.
13. Elsdon G. 1989. Embryo Transfer in Dairy Cattle. Colorado State University; Denver.
14. Hafez. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. Interamericana McGraw Hill; México D. F.
15. Lindsell C, Murpy B, Mapletoft RJ. 1986 Superovulatory and endocrine response in heifers treated with FSH at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*.26: 209-219.
16. Olson S, Seidel Jr. 2000. Reduced oxygen tension improve zygote development in chemically defined medium. *Animal Science* 78: 151-157.
17. Solomon E, Berg L, Martin D, Ville C. 1996. Biología de Villet. Interamericana McGraw Hill; México D.F.
18. Stevenson J, et al. 2000. Synchronizing estrus and ovulation in cows after combinations of GnRH, norgestomet, and prostaglandin with or without timed insemination. *Animal Science*78: 1746-1759.
19. Valencia I. 2002. Reproducción e infertilidad. Creativa; Quito.
20. Wilmut I, Campbell K, Tudge C. 2000. La Segunda creación. Grupo Z; Barcelona.

11. Tablas:

Tabla 1. Características del lactato de Ringer:

Compuesto y característica química	Concentración por cada 1000ml y valores químicos
NaCl	6g
KCl	0.3g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.2g
CH ₃ CHOHCOONa	3.1g
PH	7.0
Osmolaridad	275mOsm/litro

Tabla 2. Aplicación secuenciada e independiente de los tratamientos:

Código del animal	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
1	*	*	*	*
2	*	*	*	*
3	*	*	*	*
4	*	*	*	*
5	*	*	*	
6	*	*	*	
7	*	*	*	
8	*			
9		*	*	
10		*	*	*
11		*	*	

Tabla 3. Características ováricas post tratamientos y durante la selección:

Selección de hembras y tratamientos	Número de animales	Porcentaje de cuerpos lúteos
Selección de animales	11	73%
Tratamiento 1	8	25%
Tratamiento 2	10	90%
Tratamiento 3	10	60%
Tratamiento 4	5	40%

Tabla 4. Monitorización del estro post 48 horas de cada tratamiento:

Tratamientos	Número de animales	Presencia de estro
Tratamiento 1	8	25%
Tratamiento 2	10	40%
Tratamiento 3	10	40%
Tratamiento 4	5	40%

Tabla 5. Tiempo transcurrido para la observación del estro:

Tratamientos	Media del tiempo transcurrido
Tratamiento 1	Post 96 horas.
Tratamiento 2	Post 60 horas.
Tratamiento 3	Post 60 horas.
Tratamiento 4	Post 60 horas.

Tabla 6. Palpación rectal post superovulación y número de embriones:

Código del animal donante	Cuerpos lúteos	Embriones
6	2	0
10	5	5

Tabla 7. Características de los embriones:

Variable analizada	Número del embrión				
	1	2	3	4	5
Estado de desarrollo	Blastocisto tardío	Blastocisto temprano	Blastocisto tardío	Blastocisto tardío	Blastocisto tardío
Zona pelúcida	Desprendida	Irregular	Rota	Rota	Adherida
Apariencia del citoplasma	No granuloso	No granuloso	No granuloso	No granuloso	No granuloso
Morfología de los blastómeros	Regulares en la forma y tamaño	Regulares en la forma y tamaño	Regulares en la forma y tamaño	Regulares en la forma y tamaño	Regulares en la forma y tamaño
Membranas celulares	Distensión y ausencia de rigidez	Distensión y ausencia de rigidez	Distensión y ausencia de rigidez	Distensión y ausencia de rigidez	Distensión y ausencia de rigidez

12. Figuras:

Figura 1. Gráfico del ciclo estral en *Bos taurus*:

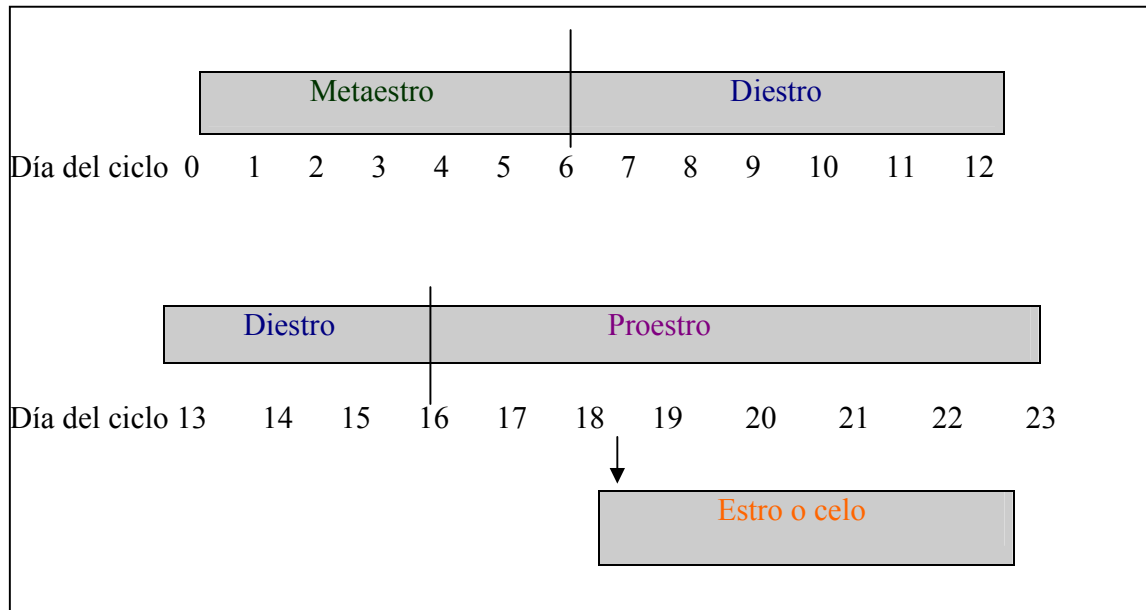
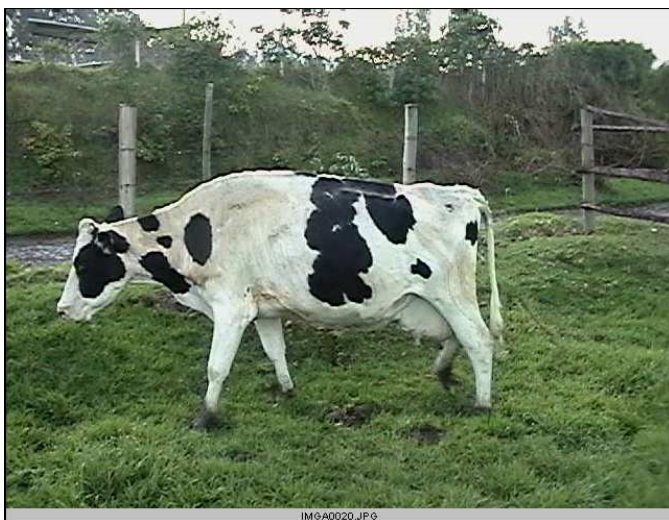


Figura 2. Gráfico de los Animales seleccionados para la superovulación:



a) hembra 6.



b) hembra 10.

Figura 3. Gráfico de la sincronización del estro con una dosis de PGF2 α :

H.A ¹		EC ³	PGF2 α ⁴	Detección estro	EC ³
		↓	↓	↓	↓
Día ²		0	1	3	8

H.A¹: Hormona aplicada

Día²: Especifica el día del tratamiento y toma a la primera exploración clínica como el día cero.

EC³: Exploración clínica.

PGF2 α ⁴: Prostaglandina F 2 α

Figura 4. Gráfico de la sincronización del celo a base de GnRH y PGF2 α :

H.A ¹	EC ³ + GnRH ⁵	EC ³	PGF2 α ⁴	Detección estro	EC ³
Día ²	0	13	18	20	28

H.A¹: Hormona aplicada

Día²: Especifica el día del tratamiento y toma a la primera exploración clínica como el día cero.

EC³: Exploración clínica.

PGF2 α ⁴: Prostaglandina F 2 α

GnRH⁵: Hormona liberadora de gonadotropinas.

Figura 5. Gráfico de la sincronización estral con dos dosis de PGF2 α :

H.A ¹	PGF2 α ³ + EC ⁴	PGF2 α ³	Detección estro	EC ⁴
Día ²	0	11	13	28

H.A¹: Hormona aplicada

Día²: Especifica el día del tratamiento y toma a la primera exploración clínica como el día cero.

PGF2 α ³: Prostaglandina F 2 α

EC⁴: Exploración clínica

Figura 6. Gráfico de la sincronización con progestágeno:

H.A ¹	Estrógeno + IP ² + EC ⁷	PGF2 α ⁵ + GnRH ⁶	-RP ³	Detección estro + EC ⁷
Día ⁴	0	9	10	11

H.A¹: Hormona aplicada

IP²: Implante de progestágeno.

RP³: Retiro del implante de progestágeno.

Día⁴: Especifica el día del tratamiento y toma a la primera exploración clínica como el día cero.

PGF2 α ⁵: Prostaglandina F 2 α

GnRH⁶: Hormona liberadora de gonadotropinas.

EC⁷: Exploración clínica

Figura 7. Gráfico de la superovulación e inseminación de la hembra 6:

H.A ¹	PGF2 α	Detección estro	(FSH*2) ³	(FSH*2) ³
Día ²	0	2	11	12
H.A ¹	(FSH*2) ³ + PGF2 α ⁵	(FSH*2) ³	Detección estro + IA ⁴	Colecta
Día ² .	13	14	15	22

H.A¹: Hormona aplicada.

Día²: Especifica el día del tratamiento y toma primera aplicación de prostaglandina como el día cero.

(FSH*2)³: Dos dosis de hormona foliculo estimulante con un intervalo de doce horas.

IA⁴: Inseminación artificial.

PGF2 α ⁵: Prostaglandina F 2 α

Figura 8. Gráfico de la superovulación e inseminación de la hembra 10:

H.A ¹	Estrógeno + IP ² + EC ⁶	FSH	(FSH*2) ⁵	(FSH*2) ⁵
Día ⁴	0	6	7	8
H.A ¹	(FSH*2) ⁵ + PGF2 α + GnRH		FSH - RP ³	Detección estro + IA ⁴
Día ⁴	9		10	11
H.A ¹	Colecta y evaluación de embriones			
Día ⁴	18			

H.A¹: Hormona aplicada

IP²: Implante de progestágeno.

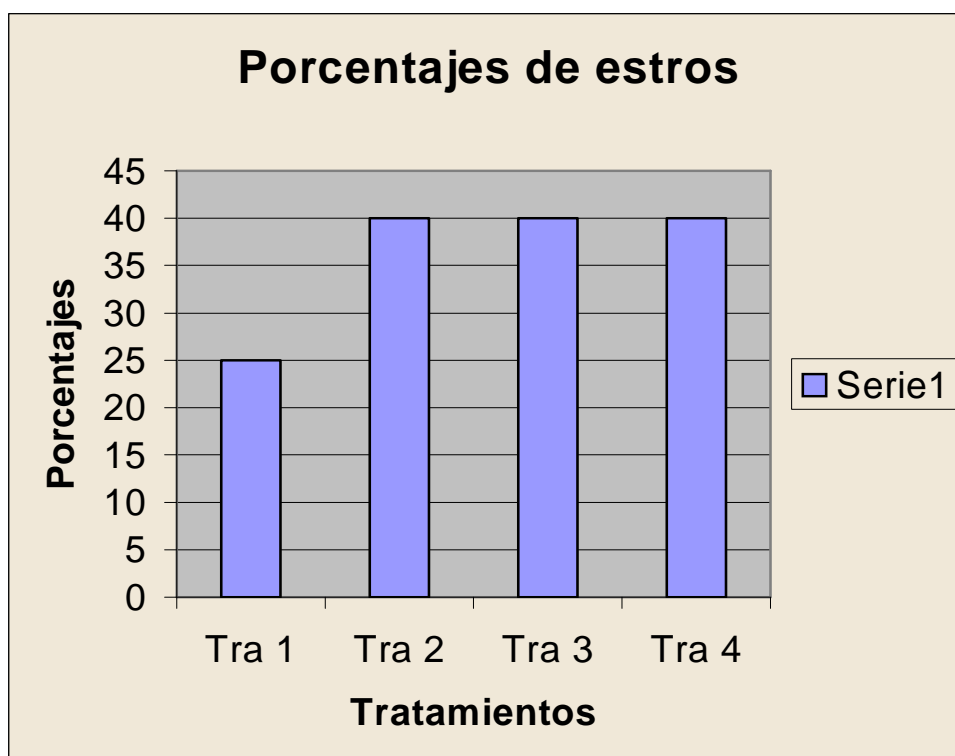
RP³: Retiro del implante de progestágeno.

Día⁴: Especifica el día del tratamiento y toma a la aplicación de progestágeno como el día cero.

(FSH*2)⁵: Dos dosis de hormona foliculos estimulante con un intervalo de doce horas.

EC⁶: Exploración clínica.

Figura 9. Gráfico de los porcentajes de estros post tratamientos:



Tra 1: Tratamiento a base de una sola dosis de $\text{PGF2}\alpha$.

Tra 2: Tratamiento a base de GnRH y $\text{PGF2}\alpha$.

Tra 3: Tratamiento a base de dos inyecciones de $\text{PGF2}\alpha$.

Tra 4: Tratamiento a base de progestágeno.

