

IV ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGADORES
DE LAS CIENCIAS PECUARIAS
IV ENICIP
Noviembre 6 y 7 de 1997

**HISTOMORFOMETRIA DE LA IMPLANTACION EN LOS DIAS 21,23,28 Y 36 DE
GESTACION EN LA VACA.**

H. DLAIKAN *, A. HERNANDEZ, CORTES, A**.**

*Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente Universidad Francisco de Paula Santander, Ocaña. **Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia.

Existe un alto grado de mortalidad embrionaria (ME) durante la implantación en la vaca (Brijaldo y col., 1982). El conocimiento del proceso de la implantación, puede aportar luces que permitan establecer métodos para reducir la incidencia de ME. Para evaluar algunas características morfológicas de la implantación, se llevó a cabo un estudio histomorfométrico el útero y trofoblasto en 8 novillas Holstein a los 21, 23, 28 y 36 días de gestación. Se utilizaron cortes de 5 micrómetros coloreados con H&E.

La modificación del epitelio de revestimiento del útero, fue de 43.59, 55.75, 39.15 y 70.64% a los 21,23,28, y 36 días respectivamente. El porcentaje de desarrollo trofoblástico fue de 46.36, 21.63, 67.2 y 83.55, para las mismas edades. El número promedio de células binucleadas por unidad de área fue de 1.5, 1.1, 1.3, y 1.6 a los 21, 23, 28 y 36 días de gestación, respectivamente. La implantación en la vaca es un proceso gradual, que se inicia cerca al embrión, extendiéndose hacia las zonas periféricas, como en la oveja (Gaviria y Hernández, 1994). Tiene relación con el grado de desarrollo trofoblástico. Esto último y la modificación del epitelio uterino de revestimiento son criterios adicionales para la evaluación post-mortem de ME, además de los reportados por Boshier (1968), que incluyen el grado de vascularización alantoidea y el número de células binucleadas.

BOSHIER, D.P. J. *Reprod. Fert.* 1968; 15:81-86.1968.

BRIJALDO, F; HERNANDEZ, A. y SCHROEDER, H. *Rev. Acovez* 6:3-6,1982.

GAVIRIA, M.T, and HERNANDEZ, A.. *Theriogenology* 41: 1139-1149.1994.

IV ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGADORES
DE LAS CIENCIAS PECUARIAS

IV ENICIP

Noviembre 6 y 7 de 1997

**MORTALIDAD EMBRIONARIA Y MORFOFISIOLOGÍA DE LA IMPLANTACIÓN
EN LA OVEJA BAJO CONDICIONES DE COMPETENCIA INTRAUTERINA**

J. Rodríguez¹; A. Hernández² y C. Jiménez²

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. Maracaibo,
Venezuela.

² Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de
Colombia. Santafé de Bogotá. Colombia.

En la oveja, se ha estudiado la vascularización del conceptus, la mortalidad embrionaria (ME) y los cambios morfofisiológicos durante la implantación [2, 3]. La ME en la oveja tiene una incidencia del 30% dentro de las pérdidas prenatales[1], por otro lado la oveja es una especie con una incidencia del 45% al 70% de gestaciones gemelares [1]. Sin embargo, no se han realizado estudios donde se tome en cuenta la sobrepoblación uterina. El propósito de este estudio fue determinar la influencia de la sobrepoblación uterina sobre el porcentaje de células binucleadas (CB) y cambios morfológicos a nivel del trofoblasto y del epitelio uterino, a los 14, 20 y 24 días de gestación en ovejas con preñeces normales y múltiples. Se utilizaron 15 ovejas distribuidas al azar en dos grupos: 1.- Preñez lograda por superovulación (SO) (1500 u.i. de PMSG), 3 animales por edad de gestación (n=9) y 2.- Preñez normal (no SO), 2 animales por edad de gestación (n=6). El sitio preferencial de nidación de los embriones ovinos, es la mitad posterior de los cuernos uterinos. La longitud de los cuernos uterinos en los animales SO es mayor ($P < 0.05$). En conceptus de embriones sometidos a competencia intrauterina el trofoblasto se desarrolla y adelgaza más tempranamente (día 14, $P < 0.01$), y también produce una modificación del epitelio uterino a más temprana edad de gestación ($P < 0.01$). En los animales SO (antes del día 20), el trofoblasto es más agresivo. Al día 14 no se encontraron CB, su porcentaje no puede ser utilizado como indicativo de sobrevivencia o ME al día 14 de gestación en la oveja, pero sí, a los 20 y 24 días, ya que en estas edades existe una correlación positiva altamente significativa entre el porcentaje de CB y la viabilidad embrionaria ($r = 0.60$; $P < 0.01$). Los cambios macroscópicos propios de una ME, no corresponden a los microscópicos. La competencia intrauterina parece acelerar el proceso de implantación.

1. DÍAZ, F. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, UN. 15-23, 1993.
2. GAVIRIA, M. T. and HERNANDEZ, A. Theriogenology. 41(5): 1139-1149, 1994.
3. GUILLOMOT. M. J. Reprod. Fertil. 49: 39-51, 1995.

IV ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGADORES
DE LAS CIENCIAS PECUARIAS
IV ENICIP

Noviembre 6 y 7 de 1997

**CAMBIOS SECUENCIALES EN LA DINAMICA FOLICULAR DE VACAS
BRAHMAN EN POSPARTO TEMPRANO EN AMAMANTE Y DESTETAS**

Z.T. Ruiz*, L.M. Greiffenstein **, M. Olivera-Angel*

*Programa de Reproducción, Universidad de Antioquia, **Laboratorio "Las Américas", Medellín, Colombia.

Los cambios en el patrón de crecimiento y desarrollo folicular en vacas Brahman fueron estudiados hasta la ocurrencia de la primera ovulación; cuatro de ellas amamantando un ternero(A) y cuatro destetadas(D) tres días posparto. Las vacas se evaluaron ultrasonográficamente cada dos días y sangradas tres veces por semana para determinar E2 por RIA.

Se analizaron los folículos a partir de 4 mm y se siguió su desarrollo para determinar su perfil de crecimiento y su posible ovulación.

Los promedios de los diámetros de los folículos dominantes (>6 mm) (FD), folículos subordinados (4 a 6 mm) (FS), y las concentraciones de E2 se muestran en la tabla para ambos grupos. Los resultados fueron comparados a través de un análisis de varianza y no se encontraron diferencias entre los grupos ($p>0.05$). Las tasas de crecimiento de los folículos (TC, mm/d) se calcularon por regresión lineal (Tabla). El análisis de correlación entre los diámetros del FD y FS, FD y los niveles de E2 no arrojaron ninguna diferencia significativa ($p>0.05$).

Las características de las estructuras ováricas en ambos grupos de vacas fue similar ($p>0.05$), pero las vacas destetas presentaron más tempranamente ondas foliculares y ovulación ($p<0.05$) (Tabla). Se concluye que hay un retraso en el desarrollo de los folículos dominantes en las vacas que amamantan y por consiguiente un retraso en la primera ovulación, pero la diferencia no se asocia con los cambios morfológicos o los niveles de estradiol.

Tabla. Características del desarrollo folicular y la concentración promedio de E2

Vacas	Folicul	FD	FS	TC-FD	TC-FS	1. OF	ID	1.Ovulac	E2(pg/ml)
A=4	9.8 ^a	9.8 ^a	4.5 ^a	1.3 ^a	0.4 ^a	33.2 ^a	0.7 ^a	27.5 ^a	22.5 ± 11.2 ^a
D=4	10.5 ^a	10 ^a	4.3 ^a	1.2 ^a	0.5 ^a	108 ^b	0.5 ^a	116.5 ^b	31.5 ± 14.1 ^a

Promedios en la misma columna con diferente exponente son diferentes ($p>0.05$)

Diámetro

OF: Día de divergencia del primer FD

id: intervalo entre el último día de la regresión de un FD y el día de la divergencia del siguiente FD.

Una interdominancia de 0 quiere decir que la divergencia del nuevo FD comenzó antes de la regresión completa del FD previo.

IV ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGADORES
DE LAS CIENCIAS PECUARIAS
IV ENICIP
Noviembre 6 y 7 de 1997

DESCRIPCIÓN DE LOS DOS PRIMEROS INTERVALOS INTEROVULATORIOS
POSTPARTO EN VACAS CEBÚ SIN TERNERO.

Henao Restrepo, G.; Olivera Angel M.

Proyecto biotecnología, Grupo BIOGENESIS. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia

Existe escasa información sobre la fisiología postparto de vacas *Bos indicus*. Esta especie presenta menor fertilidad que la *Bos taurus* (3). Estudios ultrasonográficos en *B. taurus* han mostrado que el reinicio de la actividad ovulatoria postparto, con o sin presencia de estro, antecede el tiempo de formación del primer cuerpo lúteo (4). En vacas que no amamantan, el período parto primera ovulación es menor que en las que amamantan (14.3 ± 1.2 vs 35.4 ± 2.2) (2). Este trabajo pretende describir por primera vez eventos fisiológicos que suceden durante los dos primeros intervalos interovulatorios postparto en vacas Cebú sin amamantamiento.

A partir de la segunda semana postparto de 15 vacas Cebú (10 con y 5 sin amamantamiento) se realizan exámenes ultrasonográficos ováricos cada 48 horas para caracterizar la dinámica folicular y la formación del cuerpo lúteo. Con igual frecuencia se toman muestras de sangre para determinar los niveles de progesterona por radioinmunoanálisis. Se detectan estros a mañana y tarde con la ayuda de una nevilla androgenizada. Los resultados preliminares de tres vacas sin amamantamiento que han presentado tres ovulaciones postparto se muestran en la tabla.

Tabla. Eventos reproductivos durante los dos primeros intervalos interovulatorios postparto de tres vacas Cebú sin amamantamiento.

Identif.	Calor	1°Ovul.	CL	CL vis.	P4	Calor	IntIO	Cl	CL vis.	calor	IntIO
86-2	+	17	+	9	6.8	+	16	+	10	+	24
92-4	-	52	+	12	6.1	+	14	+	12	+	23
78-1	-	46	+	15	7.8	+	18	+	15	+	21

1°Ovul.: Días parto a primera ovulación

CL: Formación de Cuerpo lúteo.

CL vis.: Días de observación ultrasonográfica de Cuerpo lúteo.

P4. Nivel de progesterona, ng/ml.

IntIO: Días de intervalo interovulatorio .

La primera ovulación postparto ocurrió sin signos de calor en dos de tres vacas, con posterior formación de cuerpo lúteo de duración variable y producción de niveles de progesterona similares a los reportados en la literatura. Después de la lisis del primer cuerpo lúteo se presenta calor en las tres vacas, con intervalos interovulatorios menores a los referenciados. Posterior a la segunda ovulación todas las vacas desarrollan cuerpo lúteo, observable durante un tiempo similar al primero. Todas las vacas presentaron estro después de la lisis del segundo cuerpo lúteo, con intervalos interovulatorios similares a los referenciados para un ciclo estral normal.

IV ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGADORES
DE LAS CIENCIAS PECUARIAS
IV ENICIP
Noviembre 6 y 7 de 1997

NIVELES DE PROGESTERONA Y ACTIVIDAD OVARICA EN CABRAS ALPINAS EN EL TROPICO ALTO COLOMBIANO

M. HURTADO; M. RUEDA; H. GRAJALES Y F. DIAZ.

Fac.Med.Vet.Zoot. Universidad Nacional - Bogotá - Colombia.

INTRODUCCIÓN. En los países de zona templada, el comportamiento reproductivo de las cabras es poliéstrico estacional, debido a la variación del fotoperíodo; por esto mismo la temporada de reproducción coincide con el otoño e invierno, cuando el fotoperíodo es menor (Gall, 1981). Este es el caso de la raza Alpina francesa en su hábitat original, pero cuando se translada a condiciones tropicales como las de Colombia, su comportamiento reproductivo pasa a ser poliéstrico continuo, ya que en este medio el fotoperíodo sólo varía de cuarenta y cinco a noventa minutos. El presente trabajo determina en animales adultos, el momento en que se reinicia la actividad ovárica después del parto en cabras Alpinas y establece el inicio de la actividad ovárica en cabras jóvenes de la misma raza y su relación con el peso de éstas.

MATERIALES Y METODOS. Se estudiaron dos grupos de cabras Alpinas en la Sabana de Bogotá (trópico alto colombiano), uno de ellos conformado por seis cabras jóvenes, en el cual se estudió el comportamiento de la actividad ovárica mediante la determinación de las concentraciones de progesterona en suero (radioinmunoanálisis en fase sólida) y el peso y edad relacionados con las concentraciones de la misma; el segundo grupo estaba constituido por siete hembras posparto a las cuales se les determinó el tiempo de reactivación ovárica posparto y la longitud de los ciclos estrales posteriores, mediante la determinación de los niveles de progesterona en leche y los datos de comportamiento estral detectados por el macho (conducta etológica).

RESULTADOS Y DISCUSION. Dos cabras del primer grupo que mostraron actividad ovárica, tuvieron un peso promedio de 26.25 kg. que corresponde al 53.6% del peso promedio de los animales adultos del rebaño, presentando una condición corporal promedio de 3; estas presentaron picos prostaglandínicos irregulares y periodos de inactividad ovárica a través del tiempo de estudio sin manifestar ninguna conducta de celo. El resto de las cabras de este grupo alcanzaron un peso promedio de 30.37 kg. que corresponde a un 62% del peso promedio adulto, al finalizar el periodo de estudio, sin presentar ningún indicio de actividad ovárica ni conducta de celo. El segundo grupo compuesto por cabras adultas, presentó en promedio un periodo de 53.83 días de recuperación ovárica posparto; se siguieron 13 ciclos estrales con una duración promedio de 18.3 días. Los ciclos estrales observados durante el estudio se clasificaron en tres grupos con base en su presencia y duración: cortos (7-14 días), los cuales representan el 46.15%; medios (21 días) que representan el 38.46% y largos (28 días) que representan el 15.38%. Las concentraciones totales de progesterona encontradas inmediatamente después de finalizar el periodo de inactividad ovárica, fueron de 2.8 ± 1.5 ng/ml., mientras que en la siguiente fase lútea las concentraciones totales fueron de 5.5 ± 3.1 ng/ml., lo que podría indicar una maduración de la función lútea, producto de la recuperación ovárica. El promedio de la concentración de progesterona obtenido en la fase estral fue de 0.33 ng/ml., en la fase luteal temprana 1.83 ng/ml. y en la fase luteal tardía alcanzó un valor de 2.36 ng/ml.

BIBLIOGRAFIA.

- ARAUJO A. Ciclo Sexual de la Cabra. Actualidades Técnicas ICA, Vol.6, No.002. 1993
GALL C. Goat Production. Inst. An. Breeding and Genetic. Academic Press, 1981.
GAO Y. and SHORT R.. Progesterone concentrations in plasma, saliva and milk of cows in different reproductive states. British Veterinary Journal, Vol.144, No.3, 1988.
SANTAMARIA A., COX J., MUÑOZ E., RODRIGUEZ R. y CALDERA L., Estudio del ciclo sexual, estacionalidad reproductiva y control del estro en la cabra criolla en Chile. International Atomic Energy Agency, Viena, 1990.

IV ENCUESTRO NACIONAL DE INVESTIGADORES
DE LAS CIENCIAS PECUARIAS

IV ENICIP

Noviembre 6 y 7 de 1997

RELACIONES ENDOCRINAS EN EL PERIPARTO DE VACAS CRIOLLAS HARTÓN DEL VALLE
R. CAMPOS G., T. BERRIO P., R. MONSALVE Y F. RIVERA

La infertilidad postparto representa uno de los mayores efectos negativos para una óptima eficiencia reproductiva en los hatos bovinos. En Colombia, el período de anestro postparto presenta diversas duraciones según raza, sistema de producción u condiciones de nutrición entre otros (GALLEGO, 1992); al momento del parto, el animal realiza un esfuerzo fisiológico y con el se liberan cantidades de cortisol, el cual unido a la acción simpaticomimética ocasionan en el organismo una alta movilización de glucosa y necesaria en procesos de alto costo metabólico (lactancia, reactivación ovárica) RIVERA & ALBEIRO, 1991. Además de los órganos genitales específicos, otros sistemas del organismo ejercen también un influjo parcialmente marcado en los fenómenos reproductivos; en especial la glándula tiroidea y la corteza adrenal; el efecto de las hormonas tiroideas en los mecanismos de la reproducción se manifiesta por la influencia ejercida sobre el metabolismo intermediario (DIEZ MONFORTE, 1993). El ganado criollo Hartón del Valle es un grupo bovino adaptado al trópico, lo cual se ve reflejado en la resistencia a enfermedades, parásitos y capacidad de reproducirse en un medio ambiente adverso, es un recurso genético valioso, que merece ser estudiado.

El objetivo del estudio fué caracterizar los niveles de T3 y T4, Cortisol y progesterona al parto y en los primeros 85 días con el fin de allegar información que posibiliten un manejo endocrino exógeno racional en caso de ser necesario.

El trabajo de campo se desarrolló en la hacienda El Carricho (Cali) 3°24'N y 76°30'W, a una altura de 990 msnm, 950mm de precipitación en promedio y temperatura de 27 °C. Se emplearon 21 vacas multiparas criollas Hartón del Valle. Mediante venipunción coxígea y sistema vacutainer se obtuvieron muestras de sangre para análisis sérico de Tiroxina, triyodotironina, Cortisol y progesterona, las muestras se colectaron el día del parto, a las 48 y 72 horas y a los días 50, 56, 63, 70 y 85 del postparto. Se empleó el método de Radioinmunoensayo en fase sólida. El análisis estadístico consistió en análisis de varianza y regresión múltiple, se analizó la relación entre las hormonas y entre éstas y la reactivación ovárica postparto.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.5$) entre los tres tiempos muestreados: parto, 24 y 48 horas postparto; los valores séricos de la hormona en las vacas Hartón del Valle fueron mayores que los reportados en la literatura, pero conservan la misma tendencia. Con respecto al número de partos se observó que las vacas de 1-2 partos presentaron niveles elevados de cortisol ($x=290.7$ ng/ml), de 3-5 partos niveles intermedios ($x=207.5$ ng/ml) y de 6 partos en adelante valores menores ($x=75.6$ ng/ml), indicándose así la influencia de la experiencia reproductiva. La relación entre cortisol y los niveles séricos de progesterona a partir del día 50 no mostró asociación, esto puede deberse a la excelente condición corporal de los animales al parto, lo cual posibilita que los animales no exhiba un Balance Energético Negativo dramático puesto que cuentan con suficiente reservas para regular sus necesidades glucogénicas. Las hormonas tiroideas mostraron similar comportamiento en el período analizado e igualmente se observó una correlación significativa entre ellas. Los valores promedio para el tiempo de muestreo fué de 1.407 nmol/L y 31.523 nmol/L para T3 y T4 respectivamente. El 83% de los animales presentó su reactivación ovárica antes del día 63, lo anterior se comprobó mediante el seguimiento sérico de estas y el cortisol; pero las tendencias generales muestran que los animales que presentaron mayores niveles de T3 y T4 en las 72 horas postparto fueron aquellos cuya reactivación ovárica se presentó antes del día 63 postparto.

Bibliografía.

- Diez Monforte, c., Fernández C. y Abad, M. 1993. Hormonas tiroideas en ganado vacuno de aptitud lechera: relación con la actividad reproductiva. Arch. Zootec. 42:435-440
Gallego M. 1993. Manejo del Problema Reproductivo en Ganado de Leche. Segunda Edición. Santafé de Bogotá.
Rivera, G. y Albeiro, R. 1991. Regulación Endocrina del anestro postparto en bovinos y ovinos. Revista Argentina de Producción Animal. Vol 11:177-204

IV ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGADORES
DE LAS CIENCIAS PECUARIAS
IV ENICIP

Noviembre 6 y 7 de 1997

TASAS DE CONCEPCIÓN Y FACTORES RELACIONADOS EN EL CRUCE DE NOVILLAS BAJO INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.

R. CAMPOS Y M. PRADO

Al usarse la Inseminación Artificial como sistema para llevar a cabo la reproducción en la explotación, se busca que su eficiencia sea máxima, para mejorar las características y la hibridación de las razas. El logro de una mayor efectividad en (IA) está sujeta a varios factores: eventos fisiológicos, condición corporal, peso y edad al servicio, factores medioambientales y de manejo. Las razas criollas presentan ventajas (TOBÓN 1996) cuando son empleadas como factor hibridador y por ende representan un recurso genético para el mejoramiento de las explotaciones bovinas en nuestro medio.

El objetivo principal se centró en evaluar la efectividad de la IA en novillas cebú al primer servicio con semen de Toros de la Raza Hartón del Valle y analizar las relaciones existentes entre tasas de concepción, variables medioambientales, corporales, época de nacimiento, destete, peso y edad al servicio, hora y temperatura de la IA y actitud comportamental de los animales en el proceso.

El trabajo se realizó en Montañita (Caquetá) 1°26'10"N y 75°25'47"W, con una altitud de 180 msnm, precipitación promedio de 3342 mm y temperatura promedio de 25.3 °C, zona clasificada según Holdridge como Bosque Húmedo Tropical. Se utilizaron 100 novillas cebú comercial, seleccionadas por fenotipo, peso superior a los 360 Kg. y sin experiencia reproductiva. Los animales se mantuvieron en pastoreo de *Brachiaria decumbens* y *sal ad libitum*. De los registros individuales se extrajo la información básica necesaria y el trabajo de campo se centró en la detección de celos, IA, toma de muestras para análisis de P4; para la detección de celos se emplearon 3 hembras androgenizadas provistas de chaleco marcador y observación visual dos veces al día por 15 minutos y un intervalo entre ellas de 10-12 horas. La IA la realizó un mismo operario, se registro hora y temperatura al momento de la IA. Se estimó el estrés, acusado por la resistencia del animal a ser inseminado, por medio de una escala cuantificable de 1 a 3, en la que se tipificaba el comportamiento del animal, donde 1 correspondía a las novillas de comportamiento difícil (animales que demoraban más de 10 minutos para entrar al sitio de Inseminación, huían o atacaba al caballo, pateaba o se caían), 2 a los animales que demoraban menos de cinco minutos para entrar al procedimiento y 3 a las mansas o de carácter dócil. Mediante venipunción coxígea se tomaron muestras a la IA y a los 25 y 45 postservicio, para análisis sérico de P4 (Alonso, et al. 1986). Se empleó el paquete estadístico de SAS, GLM (Cory, NJ), prueba de dominancia de medias y medias armónicas, se efectuó análisis de Chi-cuadrado para medir el éxito o fracaso de la IA y los factores relacionados.

Se obtuvieron tasas de concepción totales de 80.4%, tasas de concepción al primer servicio de 42.4% y 2.16 s/c. Se encontró influencia significativa de la época de nacimiento sobre los incrementos de peso pre-destete y durante el programa de IA, siendo más hábiles en la ganancia de peso los animales nacidos en épocas de transición invierno-verano. Existe influencia de la edad y el comportamiento (carácter) del animal sobre las tasas de concepción al primer servicio; animales por encima de 35 meses presentaron menores índices de preñez; animales con carácter difícil presentaron tasas de preñez al primer servicio menores que las obtenidas por animales con carácter dócil (mansas). Para las variables peso al primer servicio y temperatura al momento de la inseminación, no se encontró diferencia significativa respecto a su influencia sobre las tasas de concepción, los niveles de P4 encontrados estuvieron en los rangos normales encontrados por otros autores (OYEDIPÉ et al. 1986): para el día del celo por debajo de 1 ng/ml para los días 25 y 45 de gestación por encima de 3ng/ml, a través de esta prueba se pudo determinar la ocurrencia de casos de mortalidad embrionaria temprana.

Se concluyó, que la IA es altamente efectiva cuando las condiciones de sanidad, peso y manejo de los animales son buenas. Es posible que una de las mayores limitantes a la eficiencia biológica de la IA sea el estrés, y que las condiciones medioambientales como temperatura y humedad no sean tan significativas en el proceso. Se sugiere en próximos trabajos cuantificar la liberación de cortisol sérico para conocer más estrechamente el efecto del estrés sobre la reproducción.

Bibliografía

- Alonso, J.C. et al. 1988. Niveles séricos de P4 en algunos momentos del ciclo estral y su relación con la inseminación fecundante. Rev. Cubana de ciencias Veterinarias. Vol 19 (2).
- Oyedipe, E. et al. 1986 Plasma progesterone concentrations during the oestrous cycle and following fertile and non fertile inseminations of zebu heifers. British Veterinary Journal. Vol 142 (1).
- Tobón, C. et al. 1996 Evaluación de caracteres de crecimiento de la raza BON, cebú y sus cruces en zona de ladera. III Congreso Iberoamericano de Razas Criollas y Autóctonas, Mexorias.

IV ENCUESTRO NACIONAL DE INVESTIGADORES
DE LAS CIENCIAS PECUARIAS

IV ENICIP

Noviembre 6 y 7 de 1997

OBTENCION DE EMBRIONES BOVINOS IN VITRO. Camargo, O., Sierra, R., Berdugo, J. A, Olivera Angel, M. Programa de Biotecnología- Grupo BIOGENESIS. Facultad de Medicina .Universidad de Antioquia. Fax 94 5106062 AA 1226.

El primer reporte de nacimiento de embriones bovinos in vitro fue realizado por Brackett en 1980 ; de esta época en adelante se ha trabajado, en todo el mundo, en el desarrollo de sistemas de cultivo que permitan a los laboratorios de biología reproductiva utilizar esta técnica para la obtención de grandes cantidades de embriones y compensar, de esta manera, los altos costos de la superovulación y la obtención de los embriones in vivo. El objetivo del presente trabajo es mostrar los primeros resultados obtenidos en el laboratorio de FERTILIZACION IN VITRO, programa de Biotecnología del Grupo BIOGENESIS , Universidad de Antioquia. La metodología ha sido descrita por Olivera Angel (1992). En resumen, de los ovarios obtenidos de matadero, se aspiraron , con jeringa, los oocitos de folículos entre 4 y 10 mm de diámetro. Los oocitos fueron clasificados en 3 categorías de acuerdo a lo reportado por Sirard (1985), y madurados por 24 horas; los oocitos de categorías I y II fueron fertilizados con semen de Bos taurus, donado por el Departamento de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. El semen fue capacitado con Heparina a una concentración de 2µg/ml en el medio de fertilización. La evaluación de la fertilización se realizó a las 18 horas mediante el uso de la coloración de Hoescht para determinar la presencia de pronucleos con ayuda de un microscopio de fluorescencia a 420 nm. Los oocitos fertilizados se transfirieron a medio de crecimiento y se evaluó su desarrollo a las 96 y a las 184 horas. Todos los procedimientos se realizaron en condiciones de esterilidad y el cultivo se hizo a 39°C en atmósfera de 5 % de CO₂, en aire. Se obtuvieron 5.71 oocitos por ovario y de éstos 3 fueron de categoría I y II. El porcentaje de fertilización fue de 54 % y el de clivaje de 38 %. Del total de oocitos fertilizados se obtuvieron blastocistos en el 8 % de los casos. Al evaluar la proporción de blastocistos obtenidos con relación a la proporción oocitos fertilizados se obtuvo un valor de 25 %. El desarrollo de los embriones a las 96 horas fue de 11%, 22 %, 37 %, 30 %, respectivamente, para los estadios de 2, 4, 8 y 16 células. Para optimizar el procedimiento se iniciarán trabajos de evaluación del efecto de los cocultivos de embriones con células de granulosa. Terminada esta etapa de estandarización, que permitió el avance de algunos estudios básicos, se procederá a la criopreservación y a la transferencia de embriones para la obtención de descendencia viable.

Biol. Reprod. 23:189 - 205, 1980.

Olivera, M. De la fertilización in vitro a la transferencia de embriones. U de Antioquia. 1992

Biol. Reprod. 33 : 487 - 494 1985

IV ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGADORES
DE LAS CIENCIAS PECUARIAS
IV ENICIP
Noviembre 6 y 7 de 1997

**EFFECTO DE LA SUPEROXIDODISMUTASA Y DE LA TIOREDOXINA SOBRE
EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO.**

*O. Camargo Rodríguez, J.L. Ramírez Castro y M. Olivera-Angel
Grupo Interdisciplinario Para la Investigación Científica: BIOGENESIS*

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la superóxidodismutasa (SOD) y la tiorredoxina (Trx) sobre la maduración, la fertilización y cultivo de embriones bovinos in vitro. En el experimento I, grupos de 10 a 12 complejos cúmulus-oocito (CCOs), asignados aleatoriamente, fueron madurados en gotas de 50 µl de medio de maduración (TCM-199 + 10% suero fetal bovino + piruvato + hCG + estrógenos), suplementado con SOD: 50 (s1), 500 (s2), 1000 (s3) µg/ml o Trx: 20 (t1), 200 (t2), 1000 (t3) µg/ml o sin suplementación (Control: C) a 39 °C bajo 5% CO₂ en aire con humedad saturada por 24 h. En el experimento II, oocitos madurados in vitro distribuidos aleatoriamente, fueron fertilizados en gotas de 50 µl de medio de fertilización (IVF-TALP + espermatozoides separados mediante gradiente Percoll + 10µg/ml sulfato de heparina) suplementado con SOD: 50 (s1), 500 (s2), 1000 (s3) µg/ml o Trx: 20 (t1), 200 (t2), 1000 (t3) µg/ml o sin suplementación, bajo las mismas condiciones de incubación por 16 h. En el experimento III, oocitos madurados y fertilizados in vitro distribuidos aleatoriamente fueron co-cultivados con células epiteliales del oviducto bovino (CEOB) en un medio basado en TCM-199 + 10% suero fetal bovino + piruvato suplementado con SOD: 50 (s1), 500 (s2), 1000 (s3) µg/ml o Trx: 20 (t1), 200 (t2), 1000 (t3) µg/ml o sin suplementación por 9 días. Los experimentos I (maduración) y II (fertilización) fueron replicados tres veces, el experimento III (CIV) fue replicado 5 veces. En el experimento I, La proporción de oocitos madurados no difirió estadísticamente entre tratamientos (C: 69.5%, s1:73.3%, s2:70.0%, s3:70.0%, t1:53.3%, t2:83.3% y t3:57.1%) (P>0.05). Los porcentajes de fertilización entre tratamientos en el experimento II no fueron significativamente diferentes (C: 53.3%, s1: 53.3%, s2: 40.0%, s3: 40.0%, t1: 60.0%, t2: 43.3% y t3: 33.3%) (P>0.05). En el experimento III tampoco se registraron diferencias significativas en las tasas de clivaje, porcentaje de blastocistos y número de núcleos por blastocisto (calidad de los blastocistos) (P>0.05). La evaluación se hizo por observación directa y mediante tinción con Hoechst.

Estos resultados indicarían que la maduración, la fertilización y el desarrollo de embriones bovinos en co-cultivo con CEOB no es afectado por la adición de SOD o Trx. No obstante, hubo un evidente efecto positivo por parte de la SOD y la Trx sobre el desarrollo hasta blastocisto (C: 21.8%, s1: 31.3%, s2: 33.3%, s3: 36.5%, t1: 42.8%, t2: 39.0% y t3: 31.0%) pero dada la amplia variación de los resultados, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

Queda por investigar los efectos de estos limpiadores de radicales libres de oxígeno (SOD y Trx) sobre los espermatozoides al momento de la fertilización, dada la importancia del componente paterno en el desarrollo embrionario temprano.

IV ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGADORES
DE LAS CIENCIAS PECUARIAS

IV ENICIP

Noviembre 6 y 7 de 1997

CULTIVO DE CELULAS DE GRANULOSA BOVINA. Berdugo, J. A., Sierra, R., Diaz, J., Olivera Angel, M. . Grupo de Biotecnología, BIOGENESIS, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia. Fax 94 5106062 AA 1226.

Se ha demostrado que las células de la granulosa bovina producen estradiol, in vitro (1) y se ha sugerido que esta podría ser una de los mecanismos que explican el efecto benéfico de las mismas, sobre el potencial de los oocitos para su desarrollo hasta el estado de blastocisto. Para la maduración de los óvulos se ha usado hormona foliculo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), estradiol (E2) entre otros (2). La fuente de estas hormonas, para el trabajo in vitro, es variada; bien de fuente comercial y administrada directamente al medio de cultivo, bien a través del suero bovino fetal, suero de vaca en celo o mediante cocultivo con células de granulosa. Se ha demostrado que las células de la granulosa que interactúan con el complejo cumulus-oocito, durante la maduración in vitro, le permite obtener, a estos últimos, un mayor potencial de desarrollo (3). Con el objetivo de introducir el uso de estas células en nuestro programa de fertilización in vitro (FIV); se inició un estudio de estandarización y caracterización de estos cultivos. Se evaluará el efecto que sobre el desarrollo embrionario pudieran tener las células de granulosa. Las formulaciones de los medios de cultivo y los métodos generales de laboratorio se realizaron según Freshney (4); los ovarios fueron transportados al laboratorio en solución salina con antibióticos y una vez en el laboratorio, las células de la granulosa fueron obtenidas por aspiración del líquido folicular mediante punción de folículos de 5 mm de diámetro con jeringa plástica de 10 cc y aguja calibre 18. El líquido folicular obtenido se depositó en un tubo de ensayo cónico y se permitió la sedimentación de las células, a 1 gravedad, por media hora, posteriormente se deshechó el sobrenadante. A continuación se determinó la viabilidad de las células y se iniciaron cultivos si la viabilidad era mayor del 60%. Los acúmulos de células se colocaron en cajas de cultivo de 25cm², con 5 ml de Medio Ham's F 12 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO). Las células fueron observadas cada 12 horas con el fin de evaluar su comportamiento en cultivo, hasta la obtención de monocapas, a las 24 a 48 horas, dependiendo de la concentración inicial. Se puncionaron 22 ovarios, en diferentes épocas del año y se obtuvo células con viabilidad mayor del 60% en 16 casos y en el 100% de estos se obtuvo la monocapa esperada. La morfología de estas células es redondeada en un principio, pero al adherirse cambian a fibroblastoide. Durante las primeras 2 horas las células se adhieren y rápidamente empieza su actividad proliferativa. Una vez obtenida la monocapa se procede a la remoción con tripsina y se transfiere a nuevas cajas de cultivo a una concentración de 50.000/ml. De esta manera se hicieron hasta 5 pasajes antes de descartarlas. Se muestra un procedimiento sencillo de obtención de monocapas de células de granulosa para su uso en el programa de fertilización in vitro. Estas células al igual que los fibroblastos hacen topoinhibición, pero a diferencia de ellos pueden crecer en medio sin suplementación de suero. Una conveniencia adicional de estas células, según aparece en la literatura, es que pueden ser congeladas y descongeladas de acuerdo con las necesidades de uso.

1.- Rev. Col. Gin. Obste. 1992

2.- Theriogenology 20(6): 651 - 660 1983.

3 - Theriogenology 25: 150 Abs. 1986

4.- Freshney, J.R. Culture of animal cells. 1987

IV ENCUESTRO NACIONAL DE INVESTIGADORES
DE LAS CIENCIAS PECUARIAS

IV ENICIP

Noviembre 6 y 7 de 1997

SOBREVIVENCIA *IN-VITRO* DE EMBRIONES CONGELADOS POR VITRIFICACIÓN

Jorge Alberto Neira Solano MVZ MS. *

Daniel Tainturier MV PhD **

La posibilidad de conservar embriones al estado congelado (en nitrógeno líquido), ha sido en gran parte la clave del éxito del desarrollo de la industria de la transferencia de embriones bovinos y de su exportación. Hoy en día existe la posibilidad de simplificar los procesos de congelación de embriones, mediante la congelación directa en un medio vítrioso o viscoso, que permitiría de una parte, reducir el tiempo necesario en el procedimiento de congelación y por otro lado, reducir los costos de la técnica de criopreservación.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la sobrevivencia *IN-VITRO* de embriones de siete días, en estado de mórula compacta, jóvenes blastocitos o blastocitos expandidos, congelados en dos protocolos de vitrificación: A (20% Glycerol + 20% Ethylen-glycol + 3/8M Sacarosa + 3/8M Dextrosa), y B (20% DMSO + 20% Ethylen-glycol + 3/8M Sacarosa + 3/8M Dextrosa); comparados con el protocolo usual de congelación de embriones C; las soluciones de vitrificación fueron constituidas a partir de PBS (de laboratorios IVM Francia) suplementado con 0,4 % de albúmina de suero bovino

Después de descongelados los embriones, fueron colocados en cultivo *IN-VITRO* y observados cada doce horas, con el objeto de analizar su viabilidad y grado de desarrollo; el análisis estadístico empleado para el efecto, fue el test de "Chi cuadrado", con corrección de "Yates" cuando los efectivos calculados fueron inferiores a 5.

De 248 embriones colectados, en diferentes vacas, 104 fueron calificados como de calidad primera, para congelar de manera equilibrada de acuerdo al grado de desarrollo y teniendo en cuenta los tres protocolos descritos. 36 embriones fueron congelados de acuerdo al protocolo A, 35 con el B y 36 con el protocolo clásico.

En la descongelación en razón de alteraciones importantes en los embriones, fueron eliminados 7(19%) del protocolo A, 8(22,8%) del B, y 2(6%) del protocolo clásico. Los embriones que sobrevivieron y tuvieron algún grado de desarrollo después de 48 horas de cultivo *IN-VITRO* fueron: 55,1%(16/23) para el A; 62,9%(17/27) para el B y 74%(27/31) para el grupo de congelación clásico. La sobrevivencia *IN-VITRO* de acuerdo al número de embriones inicialmente congelados fueron: 44,4% protocolo A, 48,5% protocolo B, y 69,6% para el protocolo de congelación clásico.

En conclusión, aunque la congelación por vitrificación permite la sobrevivencia de embriones después de descongelados, los resultados de ésta técnica son todavía inferiores a los resultados de congelación por el método clásico. Con éste trabajo no se pudo establecer diferencias significativas entre los crioprotectores Glycerol y DMSO como lo citan algunos autores. Estos resultados demuestran la necesidad de seguir trabajando en la búsqueda del mejor procedimiento para vitrificar embriones, y lo más importante, confrontar resultados de sobrevivencia no sólo *IN-VITRO*, sino también *IN-VIVO*.

* Investigador adjunto del Centro de investigaciones el Nus - CORPOICA Fax: (94)8 32 30 12, A.A. 51764 Medellín - Colombia.

** Jefe del servicio de patología de la reproducción y biotecnología Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes CP 3013 44087 Nantes cedex 03 Francia