

2009

Fisiología de la reproducción bovina: desde la fecundación hasta la implantación embrionaria

Leonardo Castañeda Martínez
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria



Part of the [Veterinary Medicine Commons](#)

Citación recomendada

Castañeda Martínez, L. (2009). Fisiología de la reproducción bovina: desde la fecundación hasta la implantación embrionaria. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/313

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Medicina Veterinaria by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN BOVINA:
DESDE LA FECUNDACIÓN HASTA LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

LEONARDO CASTAÑEDA MARTINEZ
CODIGO 14031703

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
BOGOTA D.C
AÑO 2009

FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN BOVINA:
DESDE LA MONTA HASTA LA IMPLANTACION EMBRIONARIA

LEONARDO CASTAÑEDA MARTINEZ

CODIGO 14031703

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Médico Veterinario.

DIRECTOR

Dra. CRISTINA RIVAS

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
BOGOTÁ, D.C

2009

DIRECTIVOS

Rector	Hermano Carlos Gabriel Gómez Restrepo
Vicerrector de Promoción y Desarrollo Humano	Hermano Carlos Alberto Pabón Meneses
Vicerrector Administrativo	Hermano Fabio Humberto Coronado Padilla
Viserrector de Investigación y Transferencia	Dr. Manuel Cancelado Jiménez
Decano de la Facultad	Dr. Luis Carlos Villamil Jiménez
Director del Programa de Medicina Veterinaria	Dr. Pedro Pable Martínez Méndez
Director Clínica Veterinaria	Dr. Juan Pablo Pinedo Méndez
Asistente Académico	Dr. Carlos Trujillo

DEDICATORIA

A mi padre, Orlando Castañeda que con su respaldo permanente y sus consejos me ha acompañado durante mi vida y más que mi padre es mi mejor amigo, alguien que con su perseverancia ha conseguido lo que se ha propuesto y para mí es un orgullo tener a este gran hombre como padre.

A mi madre, Teresa Martínez esa gran mujer que día a día ha estado conmigo, formando el soporte fundamental de nuestra familia, que ha guiado mis pasos y junto con mi padre han formado una familia unida que se ama y se acompaña permanentemente.

A mis hermanos, Víctor y Julián Castañeda mis más grandes amigos, siempre han estado conmigo en las buenas, en las malas y me acompañan siempre con sus consejos y apoyo.

A mi esposa, Yenny Segura que con su amor y apoyo me ha acompañado en momentos felices y momentos difíciles, a esta gran mujer que se dedica a cumplir sus metas y siempre está presente.

A mi hijo, Sebastián Castañeda el motor de mi vida, a este loquito que lleno de felicidad nuestras vidas.

A todos muchas gracias y que Dios los bendiga

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cristina Rivas con su apoyo y su ayuda, formo parte fundamental para que este trabajo se realizara.

A todos los doctores que durante el transcurso de mi carrera en la universidad, compartieron conmigo todo su conocimiento y su experiencia para tener un formación profesional adecuada.

PAGINA DE ACEPTACION

DIRECTOR _____

Doctora: CRISTINA RIVAS

JURADO _____

Doctor: FERNANDO ESCOBAR CALLEJAS

JURADO _____

Doctora: GLORIA MAYOR MAYOR

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
➤ INTRODUCCIÓN	13
➤ OBJETIVOS	16
1. FOLICULOGÉNESIS Y OVULACIÓN	18
1.1 FOLICULOGÉNESIS	18
1.1.1 Crecimiento Folicular	19
1.1.1.1 Factores Estimuladores O Inhibitorios	27
1.1.1.2 Líquido folicular	29
1.1.1.3 Endocrinología del crecimiento folicular y la ovulación	30
1.1.2 Maduración del óvulo	34
1.2 OVULACIÓN	35
1.2.1 Mecanismos de ovulación	37
1.2.2 Fenómenos celulares	39
1.2.3 Regulación de la progesterona síntesis y acción en el cuerpo lúteo bovino	39
1.2.3.1 Regulación molecular de la síntesis de progesterona en CL	40
1.2.3.2 Participación del sistema noradrenérgico en la esteroidogénesis ovárica	40
1.2.4 Regresión luteal (lúteolisis)	42
1.3 OVIDUCTO	44
1.3.1 Mucosa del oviducto	45
2. FECUNDACIÓN Y SEGMENTACIÓN	47
2.1 INTERACCIÓN DEL ESPERMATOZOIDE Y EL ÓVULO	47
2.2 PERIODO OVULAR	48
2.2.1 Fertilización	48
2.2.2 Denudación del óvulo eclosionado	49
2.2.2.1 Posibles receptores en la membrana del espermatozoide y la zona pelúcida	50
2.2.3 Penetración del espermatozoide	51
2.2.3.1 Reacción acrosómica (RA)	52

2.2.4	Fusión de gametos	56
2.2.4.1	Poliespermia	59
2.2.4.2	Bloqueo de la poliespermia	59
2.3	DESARROLLO DE PRONÚCLEOS Y SINGAMIA	62
2.4	SEGMENTACIÓN	65
2.4.1	Adaptaciones uterinas, transporte y primeras divisiones del cigoto	65
2.4.2	Blastocisto, expansión y eclosión	68
3.	IMPLANTACIÓN	70
3.1	DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO	71
3.1.1	Formación del Blastocisto	71
3.1.2	Liberación del Blastocisto	71
3.1.3	Migración intrauterina	72
3.1.4	Expansión embrionaria	73
3.2	ETAPAS PREIMPLANTATORIAS Y RECONOCIMIENTO DE LA PREÑEZ	74
3.3	IMPLANTACIÓN	74
3.4	RECONOCIMIENTO DE LA PREÑEZ	77
3.4.1	Mecanismo de señalización por interferón-tau en las células endometriales	81
3.4.2	Moléculas de adhesión	82
3.5	ACEPTACIÓN INMUNOLÓGICA DEL CONCEPTUS ALOGÉNICO	82
4.	CONCLUSIONES	84
➤	BIBLIOGRAFÍA	86

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Dinámica folicular durante un ciclo estral bovino	23
Figura 2. Inhibición del desarrollo folicular dependiente de la FSH, de los factores insulínicos de crecimiento y de los estrógenos	25
Figura 3. Dinámica del desarrollo folicular ovárico y la secreción de gonadotropinas durante ciclos de dos y tres ondas	27
Figura 4. Estado del folículo poco antes de la ovulación	35
Figura 5. Posibles mecanismos en la ovulación	36
Figura 6. Esquema de los mecanismos propuestos durante la ovulación	38
Figura 7. Hormonas en la función de la célula lútea	41
Figura 8. Ruta postulada mediante la cual la $PGF_{2\alpha}$ ejerce su efecto sobre el cuerpo lúteo	42
Figura 9. Mecanismo hormonal desencadenado durante el proceso de lúteolisis	43
Figura 10. La Unión Útero-Tubal, el Istmo y el Ámpula	44
Figura 11. Oviducto de la vaca	45
Figura 12. Fertilización: adhesión y fusión	48
Figura 13. Óvulo recién eclosionado	49
Figura 14. Modelo de interacción entre los espermatozoides y la ZP	52

Figura 15. Esquema ilustrativo de las diferentes etapas producidas durante la reacción acrosómica del espermatozoide	55
Figura 16. Modelo de eventos moleculares que se suceden durante la capacitación, el reconocimiento entre los gametos y la reacción acrosomal.	56
Figura 17. Pasos de la fecundación	57
Figura 18. Diagrama de la fusión de las membranas del espermatozoide y oolema	58
Figura 19. Exocitosis de los gránulos corticales, causantes de la reacción de zona y/o del bloqueo vitelino	61
Figuras 20 y 21. Desarrollo de los pronúcleos masculino y femenino, Pronúcleos desarrollados	63
Figura 22. Unión de los pronúcleos	63
Figura 23. Inicio de la segmentación del huevo	64
Figura 24. Formación de 2 blastómeras	64
Figura 25. Esquema de las etapas más representativas del desarrollo embrionario temprano	66
Figura 26. Primera etapa del ciclo estral día 0 al 7 posestro	67
Figura 27. Relación estado embrionario ubicación en el útero	67
Figura 28. Segunda etapa del ciclo estral día 7 al 14 posestro	69
Figura 29. Etapas del desarrollo temprano en el embrión bovino	73
Figura 30. La implantación del embrión en especies domesticas no es invasiva	75
Figura 31. Condiciones endocrinas de una hembra preñada y de una no preñada	80

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de folículos ováricos	20
Tabla 2. Comparación del número de receptores de FSH y de LH entre los dos folículos más grandes de la onda folicular los días dos y cuatro	26
Tabla 3. Proteínas del espermatozoide y ligando potencial sugerido que juegan un papel en la interacción entre gametos	53

INTRODUCCIÓN

La reproducción y la nutrición constituyen funciones íntimamente ligadas al concepto de ser vivo. Para que la especie se perpetúe es necesario que se formen nuevos individuos. La reproducción permite la subsistencia de la especie a través del tiempo, mientras que la nutrición la subsistencia del individuo. (Andrade, Manrique & Peters, 2008)

A partir de las campañas regulares de vacunación que hacen parte de los Programas de Erradicación de la Fiebre Aftosa y la Brucelosis, los datos sobre el “inventario bovino” obedecen cada vez más al sentido literal de la palabra, es decir, a un conteo físico a un verdadero censo más que a la resultante de la inferencia estadística a partir de una muestra, como sucedía anteriormente. Los datos recogidos durante los ciclos de vacunación del año 2005 arrojan una población inmunizada cercana a los 22 millones de animales. No obstante, se estima que el tamaño total del hato es del orden de los 23 millones de cabezas, toda vez que la cobertura aún no es del 100% y, adicionalmente, algunos animales pueden no ser sujetos de vacunación, por diferentes motivos, entre los cuales sobresale la proximidad del sacrificio. Del total del inventario el 56% son hembras. De acuerdo con cifras del DANE, 60% del hato se destina a la producción de carne (cría, levante, ceba), el 38% al doble propósito y el resto (2%) a la lechería especializada. Dentro del inventario que está destinado a la producción de leche, se estima que existen alrededor de 4.337.837 hembras de más de dos años en sistemas doble propósito y 345.431 en sistemas de leche especializada. (FEDEGAN, PEGA 2019, 2006)

Actualmente, la ganadería colombiana cuenta con cerca de 23 millones de bovinos de diferentes razas y cruces, de los cuales el 72% corresponde a ganado Bos Índicus (cebuinos), el 15% a Bos Taurus (las llamadas razas europeas) y el 13% a las conocidas como razas criollas y sus cruces (blanco orejinegro –BON–, romosinuano, chino santandereano, costeño con cuernos, sanmartinero, y casanareño, entre otros), descendientes de los ganados también europeos que llegaron con la conquista en el siglo XV. A nivel de distribución geográfica, las razas se han aclimatado, de acuerdo con sus propias debilidades y fortalezas, en las diferentes zonas de producción. En el trópico alto se han aposentado con buena expresión genética los animales de las razas Bos Taurus, como el Holstein, el Normando, el Pardo Suizo, y el Jersey, entre otros. En el trópico bajo se concentran los cebuinos, que han mostrado una excelente adaptación a las difíciles condiciones de este entorno. Adicionalmente, los cruzamientos de Taurus-Indicus han revelado una excelente expresión en las zonas de transición (clima medio) especialmente por desarrollar la resistencia del cebú a los ecto y endo parásitos (garrapatas principalmente), que encuentran en estos pisos térmicos condiciones ideales para su manifestación, limitando el desarrollo ganadero. Las razas criollas, por su parte, se convierten en alternativa de cruzamiento por su adaptación, no sólo a las condiciones del medio, sino en cuanto a la conversión alimenticia de acuerdo con la calidad de las pasturas. (Andrade, et al., 2008)

La relación entre cabezas de ganado y la población es susceptible de convertirse en meta frente a expectativas propuestas, de un crecimiento sustantivo en el mediano plazo, tanto en el mercado interno como en el frente exportador, pero no es, en sí mismo, un indicador de productividad, pues, por el contrario, una disminución puede obedecer a un incremento de productividad (mayor ganancia de peso y menor edad al sacrificio) o a factores exógenos negativos, como la violencia y la falta de condiciones para el desarrollo rural en nuestro caso. Al examinar la relación entre la población y el inventario se observa que Colombia ha presentado un descenso significativo. Como lo establece el CEGA16, hacia 1915 el país tenía una relación de 1.2 cabezas por habitante y, hacia los años 60 esta relación baja a menos de 1 cabeza para situarse en la actualidad entre 0.6 y 0.5. (FEDEGAN, PEGA 2019, 2006)

La dinámica de la producción de leche en Colombia, ha venido acompañada por el desarrollo del consumo de productos lácteos. Esto ha llevado a alcanzar, en los últimos años, un nivel de auto abastecimiento cercano al 98.5%. La producción nacional de leche fresca ha presentado en la última mitad del siglo un aumento en forma rápida y sostenida. El Ministerio de Agricultura reportó que pasó de 728 millones de litros en 1950 a 1.879 millones en 1978 y se calcula en 6.975 millones de litros en 2004. El sistema de producción de lechería especializada aporta 52% y el de doble propósito el 48% restante. La tasa de crecimiento anual para el periodo 1994-2004 fue del 3,5%. La evolución inicial de la producción de leche en Colombia estuvo muy relacionada con el desarrollo de la ganadería de clima frío, por las ventajas que presentaban estas zonas para la adaptación de las razas especializadas en la producción de leche importadas de Europa, Norte América y Nueva Zelanda. La dinámica de la producción en esas zonas, estuvo relacionada igualmente con su cercanía a los grandes centros de consumo, en un momento en que las deficiencias en infraestructura vial impedían el flujo de leche entre regiones distantes. Todo esto contribuyó al florecimiento de la ganadería especializada, en regiones como el Altiplano Boyacense, el Oriente Antioqueño y Nariño. En estas regiones se producía la mayoría de la leche líquida que se consumía en el país. La leche que se producía en las otras regiones se comercializaba como quesos o como leche líquida destinada a mercados locales. El mayor desarrollo de la lechería especializada en Colombia, se produjo a través del mejoramiento de características como la genética, la nutrición, los sistemas de manejo, la introducción de sistemas de ordeño mecánico, la renovación y fertilización de las praderas y la suplementación de las vacas. (Andrade & col, 2008)

Productividad y Rentabilidad son conceptos complementarios. Para ser rentable hay que ser productivo, mas no es suficiente, pues la rentabilidad está asociada a factores exógenos como el nivel de tributación, o más directos como el costo del insumo Capital y, en general, de todos los insumos –bienes y servicios– necesarios para la producción. Es tan sencillo como que, para obtener más o menos rentabilidad sólo hay dos caminos: percibir más ingresos vía precio de nuestros productos, o bien, incurrir en menos gastos vía productividad (utilización eficiente de los recursos) o por insumos más baratos (escalas de producción, información oportuna, alternativas de comercialización, etc.). (FEDEGAN, PEGA 2019, 2006)

En Colombia, la salud reproductiva de la ganadería enfrenta diversos inconvenientes por factores asociados a la nutrición, el manejo de los animales y la sanidad, que, unidos, redundan en bajos

índices de natalidad y fertilidad; de ahí, que los diagnósticos de los animales deben tener una estricta rigurosidad; además, deben ser realizados por profesionales expertos, con capacidad de dar certeza sobre el estado reproductivo de los bovinos. (Andrade & col, 2008)

El presente trabajo es una revisión bibliográfica, de la fisiología de la reproducción bovina: desde el momento de la fecundación hasta que ocurre la implantación del embrión; tomando como referencia la fecundación, la segmentación y la implantación. La importancia que representa esta fase del proceso reproductivo, hace que día a día crezca más el interés hacia estos temas, la necesidad de ejercer un mayor control sobre el manejo reproductivo del hato, obliga cada vez más, a ampliar el conocimiento sobre los aspectos en los cuales los Médicos Veterinarios, tienen la posibilidad de intervenir para mejorar o controlar alguna etapa del proceso, con el fin de cumplir los objetivos propuestos en un proyecto de cría. Una de las ventajas del enfoque de sistemas de producción es que otorga una mejor visión de las variables y condiciones que afectan el proceso productivo y reproductivo. Desde el punto de vista reproductivo, existen gran cantidad de factores que afectan la reproducción y se encuentran en las primeras etapas de la reproducción. Con el propósito de mejorar los conocimientos en estas fases del ciclo reproductivo, se realizó la presente revisión que se basó principalmente en tomar los puntos de vista de autores e investigadores, para tener una mejor visión y abarcar de una mejor forma estos temas.

OBJETIVOS

GENERAL

Realizar una revisión bibliográfica profunda de un periodo fisiológico reproductivo de la hembra bovina: abarcando desde la fertilización hasta la implantación embrionaria, haciendo énfasis en las diferentes etapas por las cuales pasa la especie bovina para la concepción de un nuevo individuo, fortaleciendo y compilando los conocimientos sobre el tema facilitando de igual forma la consulta bibliográfica

ESPECÍFICOS

- Revisar el proceso de folículoogénesis y los mecanismos fisiológicos mediante los cuales se lleva a cabo la formación de los folículos que constituyen la unidad fundamental del ovario.
- Definir las etapas evolutivas del folículo, reclutamiento, selección, dominancia y los mecanismos hormonales que influyen y marcan los estados y comportamientos de la hembra bovina durante y a lo largo del ciclo estral.
- Reconocer las ondas foliculares que se presentan en el ciclo estral del bovino y de igual forma entender los ciclos de dos y tres ondas y la diferencia entre estas variantes del ciclo estral de la hembra bovina.
- Describir la ovulación, proceso mediante el cual, el ovulo listo para ser fecundado es expulsado del folículo hacia el oviducto para su posterior encuentro con el espermatozoide capacitado.
- Citar, dentro del proceso de ovulación, los mecanismos hormonales, neurológicos y fenómenos celulares que ocurren durante la fase final de la folículoogénesis y la posterior ovulación.

- Revisar la formación del cuerpo lúteo, la síntesis y mecanismo de acción de la progesterona que será la encargada inicialmente del mantenimiento de la gestación y la preparación del útero para recibir el embrión y generarle el ambiente adecuado para su normal desarrollo.
- Conocer la fecundación y segmentación, pasando por la interacción del espermatozoide con el óvulo a nivel del oviducto, conocida como periodo ovular que involucra la fertilización (con sus fases de penetración, reacción acrósomica y fusión de gametos), transporte por el oviducto, llegada del embrión al útero y su posterior fijación a este.
- Describir el proceso mediante el cual se desarrollan los pronúcleos masculino y femenino, su posterior unión (singamia) y la segmentación, división mitótica necesaria para la formación del embrión.
- Explicar los procesos fisiológicos que ocurren con la madre y el embrión en la fase de preimplantación, el desarrollo embrionario temprano (formación y liberación del blastocisto), migración uterina, expansión embrionaria y el inicio del reconocimiento de la preñez.
- Explicar la implantación del embrión, la fijación del embrión a la madre para comenzar a depender de ésta, nutrirse e iniciar su desarrollo en la fase fetal, generar un lazo más fuerte entre el embrión y la madre (reconocimiento de la preñez), para evitar el rechazo, esto mediante señales (INF-t) que van a permitir la continuación de la gestación.

1. FOLICULOGÉNESIS Y OVULACIÓN

1.1 FOLICULOGÉNESIS

La foliculogénesis es un proceso energicamente controlado que implica tanto la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa como las de la teca. Estos procesos coordinados son controlados por factores reguladores locales y sistémicos. Las gonadotropinas, FSH y LH, son esenciales para el desarrollo de los folículos antrales más allá de la etapa temprana. En el ganado vacuno y ovino, el crecimiento del folículo antral se produce en una oleada, con un patrón de 2 a 3 ondas por ciclo en el ganado vacuno y de 3 a 4 ondas en ovejas. La aparición de la onda es provocada por un aumento transitorio de las concentraciones circulantes de FSH, que promueve el crecimiento significativo de las células de la granulosa de las proteínas reguladoras del ciclo celular y aumentan la producción de estradiol y la expresión de receptores de LH. (Ryan et al, 2008)

El folículo ovárico es la unidad fundamental de la el ovario. Contiene los oocitos que puede llegar a ovular, y someterse a la fertilización de un embrión. También proporciona los esteroides y hormonas necesarias para el mantenimiento del ciclo ovárico, las características sexuales secundarias y la preparación del útero para implantación. (Findlay et al, 2009)

El proceso de foliculogénesis bovina se presenta durante los períodos prepuberal, puberal, anestro postparto, ciclo estral y primeros meses de gestación. La foliculogénesis es un proceso dinámico caracterizado por una proliferación acelerada y una diferenciación de las células somáticas que componen el folículo. (Henaó & Trujillo, 2000)

La foliculogénesis permite obtener un folículo preovulatorio o de De Graff a partir de folículos primordiales. Este proceso comienza en la vida fetal, en la cual se constituye la reserva de folículos primordiales; y en la vaca se necesitan meses para que un folículo primordial se transforme en un folículo de De Graff. (Palma, 2001)

Este evento se produce en la última etapa del embarazo o en una fase temprana del período postnatal, en la mayoría de los mamíferos. (Findlay et al, 2009)

A partir del nacimiento o poco después, un pequeño número de estos folículos primordiales entran en la senda de crecimiento durante el cual pueden degenerarse (principalmente por atresia) o completar su maduración y ovular. El concepto de que la reserva de folículos primordiales en el ovario de mamíferos no es renovable ha sido cuestionado recientemente, en particular con la propuesta que las células madre del tejido germinal intra y extraovárico podrían reponer y forman nuevos folículos primordiales. Si esta hipótesis es correcta, el número total de folículos primordiales debe seguir siendo relativamente constante, al menos en gran parte de la vida reproductiva del adulto. (Johnson, 2005, citado por: Findlay et al, 2009).

Se conoce la influencia de las hormonas locales, y de las periféricas o factores de crecimiento, en la foliculogénesis, aunque la identidad y la acción de muchos de los factores locales aún no se

entienden (Findlay et al., 2009). Entre ellos figuran miembros de la superfamilia de TGF- β que incluye TGF- β s, inhibinas, activinas, proteínas morfogenética ósea (BMP) y la diferenciación de los factores de crecimiento (GDFs) (Knight & Glister, 2006, citado por: Findlay et al, 2009).

El folículo de mayor tamaño se encarga de casi toda la secreción de estrógenos durante el estro; dicha secreción disminuye con rapidez al momento del pico de hormona luteinizante. La vaca ovula un solo folículo, el cual puede identificarse por sus dimensiones unos tres días antes del inicio del estro, cuando hay uno o dos folículos grandes secretan más estrógenos y ligan más gonadotropinas a las células de la granulosa que todos los de menor tamaño (Tabla 1). El crecimiento final en vacas ocurre en un lapso que va de 12 a 34 días, la duración total de crecimiento folicular es de más de 20 días y quizá hasta de unos seis meses. El crecimiento del folículo hasta la etapa de formación del antro no es estrictamente dependiente de gonadotropinas. (Hafez, 2002)

Oocitos en vacas y cerdas contienen un alto nivel de ácidos grasos. Por ejemplo, el contenido de ácidos grasos en oocitos inmaduros de vaca se ha estimado en 63 μ g por ovocito, con fosfolípidos que representan el 25% de todos los ácidos grasos. Ácidos grasos saturados son menos del 30% del total de la composición de ácidos grasos. (McEvoy et al, 2000, citado por: Fouladi et al, 2007)

La proporción de ácido linoleico es significativamente menor en el líquido folicular de folículos grandes (31,1% \pm 1,2% del total de ácidos grasos) que en el de los folículos pequeños (34,8% \pm 0,7% del total de ácidos grasos), y existe una significativa correlación inversa entre el diámetro del folículo y el porcentaje de ácido linoleico en el líquido folicular. También hay cambios estacionales en la capacidad de desarrollo de los ovocitos bovinos que podrían estar relacionados con cambios en la composición de ácidos grasos del mismo. Estos cambios en el perfil de ácidos grasos del fluido folicular y de los ovocitos se relacionan con cambios en la temperatura ambiental, pero también pueden relacionarse con cambios en los ingredientes de la dieta. (Zeron et al, 2001, citado por: Fouladi et al, 2007)

Los ácidos grasos se encuentran disponibles para su uso como fuente de energía durante la maduración de oocitos y el período de elongación de los embriones en desarrollo antes de la implantación en el útero, por lo tanto, la alteración en la composición de ácidos grasos en oocitos de la especie bovina pueden influenciar la maduración y posterior desarrollo del embrión. (Kim et al, 2001, citado por: Fouladi et al, 2007)

1.1.1 Crecimiento Folicular

Al nacimiento, los ovocitos de las especies mamíferas están bloqueados en la fase G2 de la profase de la primera división meiótica y tienen que reiniciar y completar la meiosis y la maduración para que la fecundación pueda llevarse a cabo. La competencia meiótica, es decir, la capacidad de los ovocitos para reiniciar y completar la meiosis, se adquiere progresivamente durante el crecimiento folicular y ovocitario y está asociada a una serie de cambios nucleares y citoplasmáticos. (Albarracín, 2005)

Tabla 1. Aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de folículos ováricos

Componentes	Características morfológicas / fisiológicas
Células de la teca	<p>Producen andrógenos en respuesta al incremento de los niveles basales de LH.</p> <p>Después de la ovulación se transforman en células luteínicas de la teca.</p>
Pared folicular	Formada por granulosa/teca separadas por lamina basal; experimenta cambios en el desarrollo relacionados con la organogénesis de la glándula endocrina/exocrina.
Células de la granulosa	<p>En folículos preovulatorios, hay conexión entre proyecciones de células de la granulosa a través de la lámina basal rota.</p> <p>Después de la ovulación, la capa granulosa es enviada por vasos/material conectivo.</p>
Corona radiada	<p>Antes de la ovulación, el ovulo se encuentra en un extremo del folículo ovárico.</p> <p>Inmerso en la masa sólida de células foliculares, el montículo ovárico (ovigero).</p>
Folículo primordial	<p>Folículos con oocitos localizados en el centro/una sola capa de células de la granulosa.</p> <p>Se diferencian a partir de células germinales primordiales (oogonios) y permanecen en una profase meiotica suspendida hasta que reanudan su maduración/ovulación y atresia.</p> <p>Crecimiento folicular, proliferación de células de la granulosa, formación de la zona pelucida, diferenciación de células de la teca.</p>
Folículo secundario	Aumenta el número de las células de la granulosa por mitosis; dichas células se hacen cuboides.
Folículo vesicular	Folículos en los que se acumula líquido folicular en el antro dentro de las células epiteliales.
Líquido folicular (en el antro)	<p>Algunos componentes tienen actividad fisiológica: inhibidor de la maduración de oocitos, inhibidor de la unión de LH, inhibina y diversas enzimas y ácido sulfúrico de condroitina.</p> <p>Contiene, solo en los folículos grandes, un elevado porcentaje de 17β estradiol en la fase folicular/progesterona durante la ovulación.</p> <p>La elevada concentración de progesterona después de la oleada de LH inhibe la actividad de aromatas localmente en el ovario.</p>
Líquido folicular (entre las células de la granulosa)	<p>Viscoso/rico en ácido hialurónico.</p> <p>El líquido se acumula a medida que se acerca la ovulación.</p> <p>Muchos oocitos viejos permanecen en la superficie folicular después de la ovulación hasta que son retirados por las fimbrias.</p>

Fuente: Reproducción e Inseminación Artificial en animales (2002)

El crecimiento y maduración folicular representan una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares de diversos componentes del folículo (tabla 1): el oocito, granulosa y teca, regidas por varios factores intraovarios e intrafoliculares y señales hormonales que conducen a la secreción de andrógenos y estrógenos (principalmente estradiol). En el crecimiento folicular intervienen la proliferación y diferenciación inducidas por hormonas de células de la teca y de la granulosa, lo que finalmente causa incremento en la capacidad de los folículos de producir estradiol y de reaccionar a las gonadotropinas. La producción de estradiol determina cuál folículo adquirirá los receptores de LH necesarios para la ovulación y la luteinización. Las perturbaciones en la respuesta de la granulosa y teca a las señales gonadotrópicas interrumpen el crecimiento folicular e inician la atresia. (Albarracín, 2005)

Existe la hipótesis que las señales endocrinas y metabólicas que regulan el crecimiento folicular también influyen en el desarrollo de oocitos ya sea a través de cambios en la concentración hormona/factor de crecimiento en el líquido folicular o por medio de la interacción granulosa-ovocito. Por ejemplo, así como la regulación del crecimiento folicular, los cambios a corto plazo en la ingesta de energía alimentaria influyen tanto sobre la morfología de ovocitos como sobre su potencial de desarrollo. (Adamiak et al, 2006, citado por: Fouladi et al, 2007)

Los ácidos grasos son fuentes ricas de energía y tienen un importante papel en la estructura y función de las membranas biológicas. Las grasas en la dieta influyen en la función reproductiva, ya sea por aumentar el balance de energía o por acciones en los procesos reproductivos que no están relacionados con la energía. (Thatcher et al, 2003, citado por: Fouladi et al, 2007)

Los principales cambios nucleares incluyen la ruptura de la vesícula germinal, condensación cromosómica y progresión a metafase I (MI), extrusión del primer corpúsculo polar y bloqueo de la metafase de la segunda división meiótica (MII). El reinicio de la meiosis es provocado por el pico preovulatorio de LH. Durante la maduración citoplasmática existe una reorganización de los organelos citoplasmáticos, comienzan la síntesis de proteínas específicas y produce un incremento de la actividad de las quinasas, iniciándose complejas cascadas de fosforilación y desfosforilación de proteínas específicas que involucran a numerosas quinasas como el *metaphase promoting factor* (MPF), la familia de las *mitogenactivated protein kinases* (MAPK), el factor citostático (CSF), el AMPc y el receptor de *epidermal growth factor* (EGFR). Se cree que estas cascadas de fosforilación activan moléculas reguladoras nucleares y ooplasmáticas. (Albarracín, 2005)

Bloqueo miótico y reinicio de la meiosis:

El pico preovulatorio de LH libera al ovocito de su primer bloqueo meiótico conduciéndolo a su segundo bloqueo meiótico MII. La progresión desde el primer al segundo bloqueo meiótico se denomina maduración ovocitaria y a partir de aquí, el ovocito está listo para ser ovulado y fecundado. Producto de la fecundación se produce la activación del ovocito que le provocará la salida del segundo bloqueo meiótico. (Albarracín, 2005)

Durante el ciclo estral del bovino hay cambios característicos en la morfología ovárica. Cerca al momento del estro el folículo ovulatorio alcanza un gran tamaño y produce cantidades importantes de estradiol, hasta inducir el pico preovulatorio de LH. En este momento un grupo de folículos

pequeños comienza a crecer lo que se llama onda folicular. De este grupo de folículos, un solo folículo se selecciona y continúa creciendo, mientras los otros se atresian. (Henao & Col., 2000)

El folículo ovárico es una unidad fisiológica equilibrada cuyo funcionamiento y estructura depende de factores extracelulares como las gonadotropinas, y de un complejo sistema de relaciones intrafoliculares. El desarrollo folicular en los bovinos ocurre en forma de ondas, conformadas por cohortes de folículos que son seleccionados para crecer a partir de la reserva de folículos “en reposo”. Entre los folículos reclutados en cada onda se establece una competencia por la dominancia, en la cual solo un folículo de la cohorte adquiere el desarrollo competente que le permitirá seguir creciendo en un ambiente de bajas concentraciones de gonadotropinas, al tiempo en que sus compañeros de cohorte sufren atresia. El folículo dominante modifica el patrón de crecimiento de los folículos subordinados en ambos ovarios, mediante la producción de factores que actúan en forma endocrina, autocrina o paracrina para autopotenciar su desarrollo e inhibir a los subordinados. (Henao & Col, 2000)

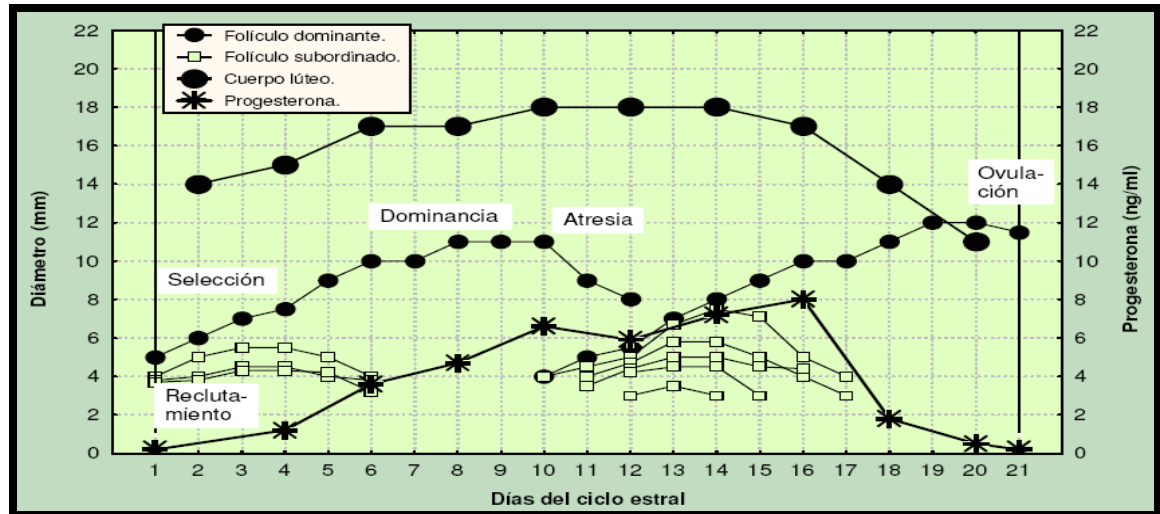
Reclutamiento Folicular

El reclutamiento folicular se refiere a la formación de una población de folículos antrales de donde uno o varios, dependiendo de la especie (monotoca o politoca), es seleccionado para la ovulación. En cada ciclo ovárico es reclutado un grupo de folículos primordiales que crecen de manera continua debido a los incrementos en las concentraciones de FSH. Aún se desconoce porqué algunos folículos inician su crecimiento tan pronto como se forman, mientras que otros permanecen en latencia durante meses, años, o aún durante décadas, dependiendo de la especie. (Espinosa & Col, 2007)

La fase inicial del crecimiento folicular, originada a partir de los folículos primordiales, presumiblemente es independiente de las gonadotropinas hipofisiarias y se caracteriza por un desarrollo lento de los folículos, que dura cuatro a seis meses, hasta su conversión en folículos antrales pequeños. En contraste con ésta, la etapa final, denominada fase folicular, que se desarrolla en forma de ondas, tiene crecimiento rápido, influenciado por las hormonas gonadotrópicas, hasta convertirse en folículo maduro. A pesar del desarrollo independiente de las gonadotropinas, se han encontrado expresiones de RNA mensajero (RNAm) para receptores de FSH en células de la granulosa de folículos bovinos con una sola capa de células, pero no se sabe cuál es su papel en esta etapa. Sin embargo, en los folículos preantrales de rata, hay un incremento en la tasa de proliferación de las células de la granulosa como respuesta a los cambios en las concentraciones de gonadotropinas periovulatorias. El desarrollo folicular bovino durante un ciclo estral normal se caracteriza por la presencia de dos o tres ondas foliculares por ciclo. Cada onda comprende el reclutamiento de una cohorte de folículos antrales pequeños en la superficie de los ovarios y la selección de un folículo dominante que continúa creciendo, mientras los demás desarrollan atresia. El reclutamiento es el proceso por el cual un grupo de folículos, provenientes del conjunto de folículos en crecimiento lento (desarrollados durante los anteriores cuatro a seis meses), inicia un crecimiento rápido bajo el estímulo de la oleada de FSH. Cuando la FSH alcanza el pico de concentración, los folículos más grandes de la onda tienen un diámetro de aproximadamente cuatro mm. Tres días después, cuando los folículos más grandes miden aproximadamente ocho mm de

diámetro, se selecciona un solo folículo para continuar creciendo que se transforma en dominante, mientras que los demás regresan (Figura 1). (Henao & Col, 2000)

Figura 1 Dinámica folicular durante un ciclo estral bovino



Fuente Establecimiento y desarrollo de la dominancia folicular bovina (2000)

Selección y Divergencia Del Folículo Dominante

La selección de un folículo dominante se refiere al mecanismo que determina cuál folículo de la cohorte es seleccionado para continuar creciendo y convertirse en dominante. El principal evento morfológico en el proceso de selección es la divergencia. La divergencia corresponde al tiempo durante el cual el folículo dominante y el subordinado más desarrollado crecen a tasas diferentes, antes de que el subordinado manifieste atresia. De los folículos maduros, el mayor de los folículos de la cohorte produce altos niveles de estradiol e inhibinas. Esto inhibe la secreción de FSH, la disminución de las concentraciones de FSH inicia la atresia y la regresión de los folículos pequeños (subordinado), mientras que el folículo mayor (dominante) cambia su dependencia de FSH y LH lo que evita la regresión. La FSH y LH ejercen su efecto estimulador en la proliferación celular y la esteroidogénesis por su unión a la proteína G específica para receptores acoplados, que a su vez provoca un aumento en la producción del cAMP y la activación de la vía PKA. Si bien la PKA/cAMP vía de transducción, es generalmente considerado como el principal mediador de las hormonas gonadotrópicas, las vías de acción de estas hormonas también activan otras señalizaciones que incluyen la activación de la vía Erk, la vía Akt y el inositol trifosfato y las vías del diacilglicerol. Estas vías de transducción de señales, cuando están activadas, inducen cambios en la actividad de las proteínas y la expresión de los genes. (Ryan et al, 2008)

El proceso de divergencia puede desarrollarse de tres maneras:

1. El folículo dominante y el subordinado más desarrollado divergen gradualmente en diámetro entre los días cero y cuatro de la onda folicular.

2. El folículo dominante y el subordinado más desarrollado tienen diámetros semejantes hasta el momento de la divergencia.

3. Ocasionalmente un folículo subordinado puede ser inicialmente más grande que el futuro folículo dominante, pero crece a menor tasa y no alcanza el estado decisivo. (Henao & Col, 2000)

El mecanismo que establece la divergencia entre los folículos comprende la interacción de varios factores. Se considera que la FSH y los estrógenos actúan sinérgicamente para acelerar el crecimiento folicular. Para que ocurra el reclutamiento de los folículos que conforman la onda, todos los folículos de ambos ovarios reciben una señal específica: un ligero incremento de los niveles plasmáticos de FSH, que ocurre el día cero de la onda folicular, repitiéndose entre los días ocho y 10.5 en las vacas con dos ondas foliculares. (Henao & Col, 2000)

La aparición de una nueva onda folicular y la selección del folículo dominante se asocian temporalmente con un aumento y caída en las concentraciones circulantes de FSH (Figura 3). La aparición de una nueva onda folicular es precedida por un aumento en las concentraciones plasmáticas de FSH en ondas espontáneas y ondas inducidas. Los productos foliculares, especialmente los del folículo dominante, son responsables de la represión y la liberación de FSH, por lo tanto, de la aparición de la onda folicular siguiente (Figura 3). Al final del período de dominio (es decir, en la ovulación, o la mitad de la fase estática de un folículo dominante anovulatorio), las concentraciones circulantes de FSH comienzan a aumentar 1,5 a 2 veces en los próximos 2 días, y tienen su pico aproximadamente 12-24 horas antes de la aparición de la onda (cuando el folículo dominante futuro es de 4-5 mm de diámetro). Si un folículo dominante existente se retira (por ablación folicular), un aumento de la FSH comienza dentro de las 12 horas siguientes, lo que resulta en la aparición de una nueva onda folicular en las próximas 24 horas. La selección del folículo dominante se asocia con la disminución de las concentraciones de FSH en la sangre durante los primeros 3 días de la ola. Los receptores de FSH están presentes sólo en las células de la granulosa, mientras que los receptores de LH se encuentran en ambas células, de la granulosa y de la teca en la pared de los folículos antrales. El folículo dominante adquiere más receptores de LH en las células de la granulosa, que sus subordinados y por lo tanto es capaz de cambiar su dependencia de gonadotropinas, a LH durante el nivel más bajo de FSH y continuará creciendo mientras la regresión de los subordinados. (Adams et al, 2008)

Número de células de la granulosa

Se podría pensar que el folículo dominante tiene mayor cantidad de células de la granulosa para responder a las concentraciones basales de FSH, pero ello no es así. El recuento de células de la granulosa en folículos dominantes y subordinados de dos días, efectuado por (Bodensteiner, citado por Henao et al., 2000), no mostró diferencia entre ambos tipos de folículos. (Tian, citado por Henao et al., 2000), tampoco encontraron diferencias en el número de células de la granulosa entre folículos cuando se inicia el estímulo gonadotrópico. (Henao & Col, 2000)

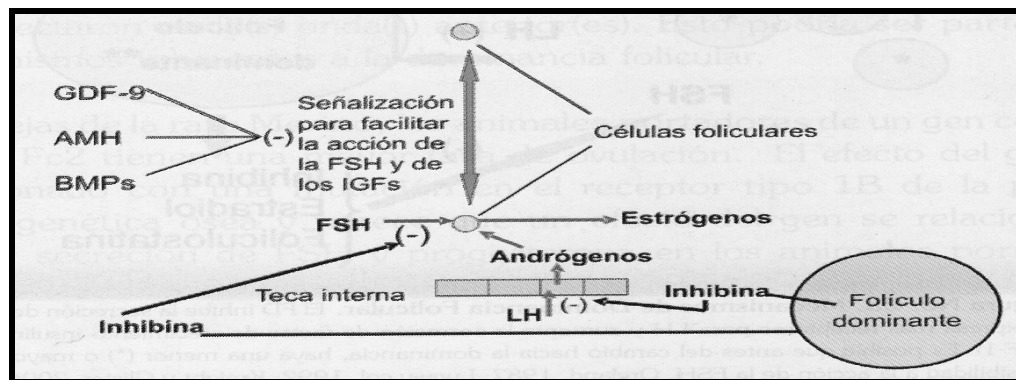
Número de receptores para gonadotropinas

Bodensteiner, citado por Henao et al., (2000) marcaron radiactivamente y contaron los receptores para FSH (FSH-R) y LH (LH-R) por célula de la granulosa en los folículos dominantes y subordinados los días dos y cuatro de la onda y encontraron que el día dos no se presentaron diferencias en el número de FSH-R y LH-R por célula y por folículo, pero el día cuatro las diferencias entre ambos tipos de folículos eran altamente significativas para FSH-R y significativas para LH-R en favor de los folículos dominantes. Sin embargo, no encontraron diferencias en los niveles de expresión génica para FSH-R en células de la granulosa de folículos bovinos que medían entre 0.5 y 14 mm de diámetro y solo hallaron expresión de genes para LH-R en folículos mayores de nueve mm, lo cual sugiere que los FSH-R no limitan el establecimiento de la dominancia (Tabla 2).

La expresión de un mayor número de receptores para LH en las células de la granulosa se consideró como un mecanismo para la adquisición de dominancia en el ovario de la vaca. (Sartori et al, 2001, Citado Por: Hernández et al., 2008)

La selección del folículo dominante en especies que tienen una sola ovulación por ciclo estral, puede depender de una diferente sensibilidad a la FSH de los folículos en crecimiento. Los cambios intrafoliculares de la función de las activinas, el factor de crecimiento y diferenciación (GDF-9), la hormona antiparameconéfrica (AMH) y varias proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), podrían contribuir al proceso de selección folicular, a través de la inhibición de las vías de señalización en las células de la granulosa, dependientes de la FSH y de los IGF. La activina puede jugar un papel positivo en la maduración del Oocito y la adquisición de competencia en el desarrollo del folículo dominante. Es posible que la inhibina secretada de forma creciente en el folículo dominante disminuya la secreción de andrógenos, mediada por la LH en las células de la teca interna, la cual es necesaria para sostener una alta producción de estrógenos en las células de la granulosa. (Figura 2). (Knight & Glister, 2006, Citado Por: Hernández et al., 2008)

Figura 2. Inhibición del desarrollo folicular dependiente de la FSH, de los factores insulínicos de crecimiento y de los estrógenos.



GDF9; factor de crecimiento y diferenciación, AMH; hormona antiparameconéfrica, BMPs; proteínas morfogenéticas óseas.

Fuente. Reproducción en la Vaca Fisiología y Aplicaciones (2008)

Los folículos dominantes sufren ciertos cambios que anteceden a la maduración, como son la vacuolización del nucléolo de las células foliculares en el periodo comprendido entre la lúteolisis y la aparición del pico de secreción de LH. Así mismo, los folículos subordinados pueden sufrir maduración meiótica. (Assey et al, 1994, Citado Por: Hernández et al, 2008)

Tabla 2. Comparación del número de receptores de FSH y de LH entre los dos folículos más grandes de la onda folicular los días dos y cuatro.

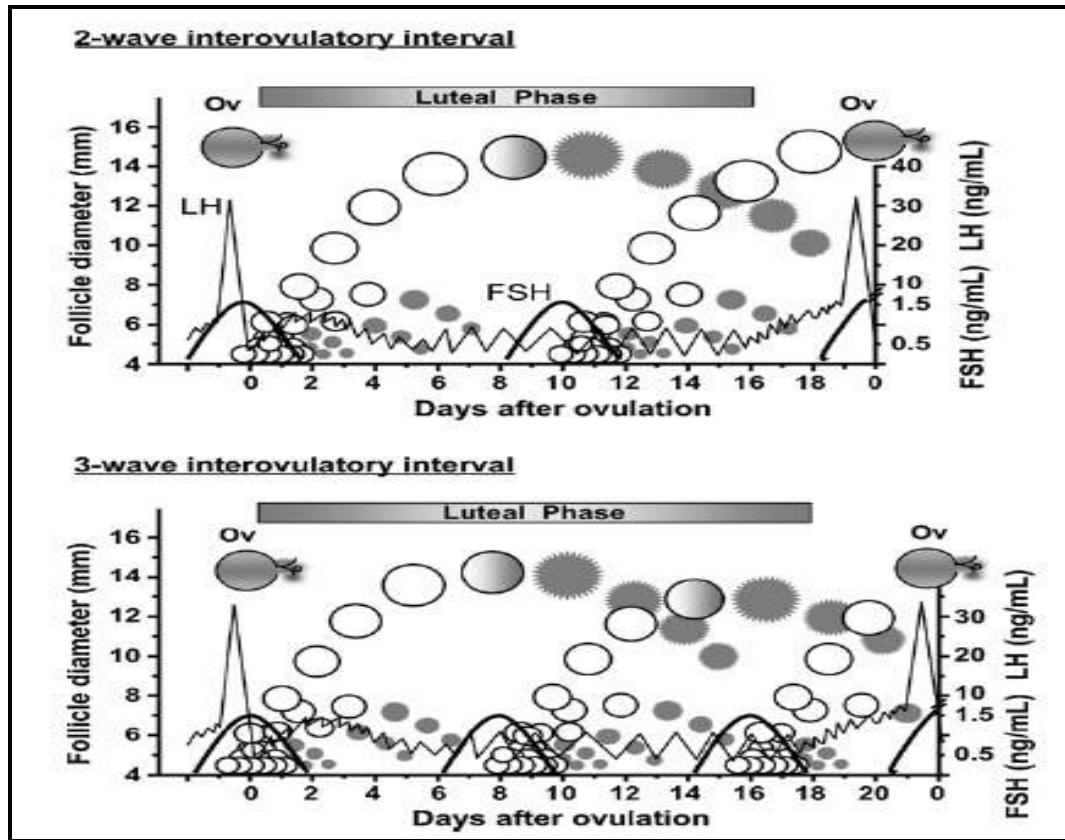
Característica	Día 2		Día 4	
	Folículo más Grande	Segundo más grande	Folículo más grande	Segundo más grande
Diámetro folicular (mm)	8.5±0.5	7.3±0.7	13±0.9	8.9±0.5**
Estradiol (ng/ml)	373±151	42±26**	265±23	6±2*
Estradiol (ng/folículo)	161±89	21±1	305±33	2±1**
Progesterona (ng/ml)	12.2±2.3	20.1±8.6	17.1±1.6	21.1±13.3
Estradiol / Progesterona	26±13.9	9.5±8.8	15.2±2.9	0.98±0.5
Células de la Granulosa/Folículo (10 ⁶)	26±5	16±4	30±7	10±3**
FSH-R/Célula	6011±711	8925±2246	14196±8045	4322±953
FSH-R/Folículo (10 ⁶)	15.8±3.8	12.5±1.4	34.9±14.6	3.6±0.7**
LH-R/Célula	2344±1790	3013±1234	7521±3112	712±361*
LH-R/Folículo(10 ⁶)	6.8±5.4	4.9±2	19.3±6.8	0.97±0.5*

** (P<0.05) * (P<0.01)

Fuente: Establecimiento y desarrollo de la dominancia folicular bovina (2000)

La mayoría de los ciclos estrales de los bovinos (es decir, > 95%) se componen de dos o tres ondas foliculares. Algunos han informado de la preponderancia (> 80%) de cualquier patrón de dos o tres ondas, mientras que otros han informado de una distribución más uniforme. En ambos ciclos estrales de dos y tres ondas, la aparición de la onda folicular ocurre por primera vez de forma consecutiva el día de la ovulación (día 0). El surgimiento de la segunda onda se produce el día 9 o 10 en ciclos de dos ondas, y el día 8 o 9 en ciclos de tres ondas. En ciclos de tres ondas, una tercera onda surge el día 15 o 16. Bajo la influencia de la progesterona (por ejemplo, en diestro), los folículos dominantes de las sucesivas oleadas sufren atresia. El presente folículo dominante en el inicio de la luteólisis se convierte en el folículo ovulatorio y el surgimiento de la nueva onda se retrasa hasta el día de la ovulación subsiguiente. El CL comienza a retroceder antes (Día 16) en ciclos de dos ondas, que en los ciclos de tres ondas (Día 19) resultando en un ciclo estral en consecuencia más corto (19-20 días frente a 22-23 días). Por lo tanto, el llamado ciclo estral de 21 días en el ganado sólo existe en el promedio entre los ciclos de dos y tres ondas (Figura 3). (Adams et al, 2008)

Figura. 3 Dinámica del desarrollo folicular ovárico y la secreción de gonadotropinas durante ciclos de dos y tres ondas



Dinámica del desarrollo folicular ovárico y la secreción de gonadotropinas durante ciclos de dos y tres ondas en el estro del ganado. Folículos dominantes y subordinados se indican como abierto (viables) o los círculos en sombra (atrésico). Un incremento en las concentraciones circulantes de FSH (línea gruesa) precede a la aparición de cada onda. Un incremento en las concentraciones circulantes de LH (línea fina) precede a la ovulación. El pico de LH es precedido y sucedido por un período de alta frecuencia pulsos de LH como consecuencia de las bajas concentraciones circulantes de progesterona (es decir, el período de luteólisis y luteogenesis, respectivamente).

Fuente: Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle (2008)

1.1.1.1 Factores Estimuladores O Inhibitorios

Además de las gonadotropinas, existen numerosos factores de crecimiento reguladores intraovarios del desarrollo y función del folículo que incluyen el factor de crecimiento insulínico (IGF) y los miembros de la superfamilia del TGF- β (por ejemplo, la inhibina-A y activina-A). Se ha establecido que el IGF estimula la proliferación de las células de la granulosa y la teca y aumenta la capacidad de las gonadotropinas para estimular la esteroidogénesis tanto en las células de la granulosa como de la teca. Además, se ha demostrado que el IGF tiene un efecto directo contra la apoptosis y es expresado selectivamente en los folículos sanos en comparación con los folículos pequeños atrésicos. (Ryan et al, 2008)

- **Inhibinas.** Las inhibinas (A y B) son heterodímeros formados por una subunidad **a** común y una de dos subunidades **b** (bA y bB) altamente homólogas. Se han clasificado siete formas de inhibina en fluido folicular bovino por medio de análisis inmunoradiométrico (IRMA) y radioinmunoanálisis (RIA). La inhibina estimula la producción de andrógenos por las células de la teca interna de folículos de rata y humano *in vitro*. Si esto ocurriera *in vivo*, se podría suponer que la inhibina mejora la producción del andrógeno como sustrato para su aromatización en estrógenos, lo cual es de gran importancia para el folículo que inicia la dominancia. La producción de inhibina se aumenta paulatinamente cuando se sintetizan estrógenos foliculares durante el crecimiento del folículo dominante, evento que decrece los niveles de FSH y restringe el crecimiento de los folículos subordinados, al mismo tiempo que incrementa la producción de más andrógenos en las células tecales del folículo dominante. (Henao & Col, 2000)
- **Activinas (ACTs).** Las activinas son homodímeros o heterodímeros de las subunidades **b** de inhibina (bAbA, bBbB, bAbB). Una de las proteínas que más temprano se expresa en el proceso de crecimiento folicular es la activina. En células de la granulosa indiferenciadas de folículos preantrales, la ACT actúa autocrinamente en la transformación de la célula gonadotropina-independiente a gonadotropina-dependiente, mediante la activación de los FSH-R (FSH receptor). La FSH actúa luego sobre la célula para estimularla a producir más ACT y más receptores de activina (RACT), en un sistema autoinductivo de retroalimentación positiva. La FSH y la activina juntas, aumentan el número de FSH-R en la célula parcialmente diferenciada. La FSH y la ACT también inducen la producción de folistatina (FSP), que modula la acción de la ACT. Los efectos estimulatorios de la ACT sobre el AMPc, la actividad aromataasa, la producción de estradiol y de receptores para gonadotropinas, indican que la activina promueve la diferenciación de células de la granulosa y previene la luteinización y la atresia. (Henao & Col, 2000)
- **Folistatina (FSP).** La folistatina es un polipéptido de cadena simple que se expresa en las células de la granulosa y regula la bioactividad de la inhibina y la activina uniéndose a su subunidad común **b**. Aún no se conoce bien el mecanismo por el cual la folistatina regula a la inhibina y a la activina. Se requieren más estudios que aclaren su función. Aunque se sabe que la folistatina se expresa en una serie de tejidos, un sitio importante de la producción son las células de la granulosa de los folículos ováricos. En los bovinos, los aumentos de la señal de la folistatina ARNm aumentan a medida que el tamaño del folículo aumenta, la señal más fuerte se observó en los folículos preovulatorios. Basados en datos obtenidos *in vitro*, se ha hipotetizado que la folistatina modula la función de las células de la granulosa de forma autocrina y sus acciones a favor de la luteinización o atresia. Si bien la regulación, la producción y las acciones de la folistatina han sido ampliamente estudiados *in vitro*, los datos sobre su función *in vivo* son escasos y confusos, no han sido considerados en relación con la dinámica folicular. El uso de la ultrasonografía llevó a la identificación de las ondas foliculares en ganado bovino y ahora sabemos que el ciclo estral está constituido por 2 o 3 ondas de este tipo. La aparición de sucesivas ondas foliculares durante el ciclo estral se asoció con aumentos en las concentraciones circulantes de FSH. (Singh et al, 1999)
- **Factores de crecimiento insulinoide (IGFs).** En folículos preantrales sanos, el factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I) puede mediar el efecto estimulador de la FSH sobre la proliferación de las células de la granulosa, produciendo un incremento gradual del crecimiento folicular hasta la formación del antro. La bioactividad de IGFs está controlada por su asociación

con una familia específica de IGF-unido a proteínas (IGFBP), que se encuentran en asociación con la matriz extracelular (ECM) y las membranas celulares, así como en el líquido folicular. Seis IGFBP han sido identificados y estas proteínas pueden inhibir o facilitar la acción del IGF, en función de los cambios post-translación como la fosforilación, la degradación proteolítica o unión a la ECM (Monget & Bondy, 2000). El sistema IGF ha sido bien caracterizado en folículos antrales de la especie bovina (Armstrong et al. 1998, 2000), pero hay menos estudios sobre los efectos del IGF en las primeras etapas del desarrollo folicular. Hasta la fecha, la expresión de ARNm que codifica la IGFBP-2 a 5 se han encontrado en los folículos de la especie bovina y la expresión de IGFBP-2, 4 y 5 en los folículos de la especie ovina (Armstrong & Webb 1997, Webb & Armstrong, 1998). El IGFBP-2 y 4 en la expresión de ARNm en folículos antrales no atrésicos de la especie bovina se limita a los tejidos de la granulosa y teca, respectivamente (Armstrong et al. 1998). Durante el desarrollo folicular y la atresia, se presentan distintos cambios en la expresión temporal y espacial de estas proteínas in vivo. Por ejemplo, durante el desarrollo de la dominancia folicular las cantidades de IGFBP-2, 4 y 5 intrafolicular disminuyen, mientras que durante la atresia, se incrementan los niveles de estas proteínas (Austin et al. 2001). Además, la proteólisis de la IGFBP-4 y 5 en el líquido folicular se ha demostrado que tiene implicaciones en la selección y dominancia folicular en el bovino (Rivera & Fortune, 2003). Así, los cambios en la expresión de IGFBP, junto con los cambios en la actividad de las IGFBP-proteasas específicas, proporcionan un mecanismo para regular la biodisponibilidad de IGFs en foliculogénesis (Armstrong et al. 1998). Poco se sabe sobre el papel del sistema IGF en el desarrollo de folículos preantral. Sin embargo, la unión de IGF-I se ha demostrado en los folículos preantrales de la especie bovina (Wandji et al. 1992), y el receptor IGF tipo 1 del ARNm se ha detectado en las células de la teca y de la granulosa en ovocitos preantrales de la especie bovina (Armstrong et al. 2000). Además, el IGFBP-2 ARNm se ha detectado en células de la granulosa y ovocitos, el IGFBP-3 ARNm en ovocitos de folículos preantrales bovinos (Armstrong et al. 2002). (Citado por Thomas et al, 2007). Las vías Akt y Erk son consideradas las principales vías de señalización que median en los efectos de IGF. (Ryan et al, 2008)

1.1.1.2 Líquido folicular

El líquido folicular se origina principalmente en el plasma periférico por trasudación a través de la lámina basal del folículo y se acumula en el antro.

Composición bioquímica del líquido folicular

Se trata de un trasudado sérico modificado por actividades metabólicas foliculares, posee constituyentes específicos como esteroides y glucoproteínas sintetizadas por las células de la pared folicular. Durante el crecimiento del folículo, se establece un equilibrio entre el suero y el líquido mencionado. Las concentraciones metabólicas son similares en los compartimentos y también en las secreciones del oviducto. El líquido contiene varios compuestos de gran importancia fisiológica, la mayor parte de ellas en concentraciones similares a las del suero sanguíneo. En los folículos antrales grandes, a diferencia de lo que ocurre en los pequeños, el líquido contiene concentraciones grandes de 17β estradiol en la fase folicular, y de progesterona conforme se aproxima a la evolución. Sin embargo los ovarios poliquísticos tienen altas concentraciones de androstenediona. (Hafez, 2002)

Los folículos ováricos viables también acumulan y secretan varias sustancias no esteroideas fisiológicamente activas:

- Inhibidor de la maduración de los oocitos, consistente en un polipéptido con peso molecular de 1500 Dalton
- Inhibidor de la luteinización, que es una proteína compleja
- Proteína inhibidora de unos 1400 Dalton
- Relaxina, un polipéptido de alrededor de 9000 Dalton
- Inhibina (supresora de la actividad de FSH), de alto peso molecular

Funciones del líquido folicular

El líquido folicular es importante en los aspectos fisiológico, bioquímico y metabólico de la maduración nuclear y citoplasmática del oocito. El líquido folicular experimenta notables cambios durante todo el ciclo estral y realiza varias funciones, entre las que se incluyen las siguientes:

- a) Regulación de las funciones de las células de la granulosa, inicio del crecimiento folicular y esteroidogénesis.
- b) Maduración de oocitos, ovulación y transporte del ovulo al oviducto
- c) Preparación del folículo para la posterior formación del cuerpo amarillo
- d) Los factores estimulador e inhibidor en el líquido que regulan el ciclo folicular.
- e) El volumen de líquido liberado durante la ovulación, junto con las secreciones del oviducto, del ambiente en que ocurren el metabolismo y la capacitación de los espermatozoides y el desarrollo embrionario temprano. (Hafez, 2000)

1.1.1.3 Endocrinología del crecimiento folicular y la ovulación

El hipotálamo es una región del cerebro que controla un gran número de funciones corporales. Está localizado en el piso del tercer ventrículo y constituido por una serie de núcleos que contienen cuerpos neuronales que reciben impulsos de múltiples zonas del encéfalo y cuyas terminaciones nerviosas (axones) llegan así mismo a innumerables zonas intra y extra encefálicas. Neuronas procedentes de los núcleos supra y paraventriculares del hipotálamo termina en la neurohipófisis y las de otros núcleos vierten hacia la adenohipófisis el factor liberador de las gonadotropinas (GnRH), moléculas que llegan hasta los receptores de células basófilas de la adenohipófisis especializadas en elaborar la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Éstas son denominadas en conjunto gonadotropinas y tienen receptores, la FSH en las células foliculares y la LH en esas mismas células y en las células de la teca interna. Antes de la ovulación, los andrógenos producidos en la teca interna, como resultado de la inducción de la LH sobre sus células para el efecto, pasan hacia las células foliculares, en donde son convertidos en estrógenos (inductores de estro o receptividad sexual). Cuando sucede la ovulación, las células de la teca interna y las foliculares, por acción de la LH, inician la producción de progesterona y se forma el cuerpo lúteo en el sitio que ocupa el folículo ovulado. Para una discusión más amplia de las interacciones de las hormonas del hipotálamo, la hipófisis y del ovario. (Hernández et al., 2008)

El crecimiento, maduración, ovulación y luteinización del folículo de Graaf dependen de patrones apropiados de secreción, concentraciones suficientes y proporciones adecuadas de FSH y LH en suero. Entre las hormonas participantes se incluyen esteroides, prostaglandinas y glucoproteínas. La FSH tiene la función importante en el inicio de la formación del anro. Esta gonadotropina estimula la mitosis de las células de la granulosa y la formación del líquido folicular. Además, la hormona foliculoestimulante induce la sensibilidad de las células de la granulosa hacia la hormona luteinizante al incrementar el número de receptores para esta última. (Hafez, 2002)

Hormona de liberación de gonadotropinas (GnRH): El hipotálamo es el órgano encargado de convertir las señales neurológicas originadas en estímulos externos e internos en descargas hormonales. Uno de sus productos es la hormona GnRH. La GnRH está regulada por la secreción endógena de diversas hormonas encontrándose entre ellas la melatonina. Esta última se libera por estímulo de la oscuridad. Es decir, que un impulso nervioso percibido por la retina se transforma en liberación de melatonina desde la glándula pineal. (Gigli, et al., 2006).

Hormonas Gonadotróficas: La hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) son glicoproteínas producidas por la hipófisis. Al igual que la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG) y la tirotrófina (TSH), están formadas por la unión de las subunidades α y β . La subunidad α es específica de especie y es idéntica en las otras hormonas glicoproteicas mencionadas. La subunidad β determina la función biológica de cada hormona. (Gigli, et al., 2006).

- ❖ **Hormona folículo estimulante (FSH):** La FSH es necesaria para el reclutamiento de folículos antrales. Las células de la teca interna de los folículos terciarios responden al estímulo de la FSH produciendo andrógenos y estimulando la activación de la enzima aromatasa en las células de la granulosa y transformando a los andrógenos en estradiol. La FSH también está involucrada en el aumento de la vascularización del folículo dominante. El aumento de la irrigación permite una mayor obtención de nutrientes.
- ❖ **Hormona luteinizante (LH):** La función de la LH es reiniciar la meiosis en el folículo preovulatorio, desencadenar la ovulación y controlar el desarrollo y mantenimiento del cuerpo luteo (CL). Ejerce su acción uniéndose a receptores de membrana en las células de la granulosa y tecales del folículo preovulatorio. Produce un aumento de AMPc vía adenil ciclasa, estimulando la conversión de colesterol en pregnenolona y desencadenando los sucesos de la ovulación que se detallarán más adelante. (Gigli, et al., 2006).

Sistema del factor de crecimiento tipo insulínico (IGF): Estos factores se denominan así por tener una secuencia de aminoácidos muy similar a la insulina. Son producidos por las células de la granulosa y teca y son quizás los factores intraováricos mejor caracterizados. En el ovario se han identificados el IGF-I y el IGF-II. La acción se encuentra regulada por un sistema formado por 6 proteínas, IGFBP (siglas en inglés de proteínas de unión del factor de crecimiento tipo insulínico). (Gigli, et al., 2006).

Familia de factores transformadores de crecimiento (TGF): Los miembros de esta superfamilia, integrada por más de 40 proteínas, regulan la proliferación y diferenciación en una amplia variedad de tejidos. Actúan a través de señales intracelulares que activan la cascada serina-treonina quinasa resultando en la translocación de proteínas desde el citoplasma al núcleo celular. Dentro de estos

factores se encuentra los **TGF β** , **el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9)**, **la hormona antimülleriana (AMH)**, **activinas, inhibinas y la proteína morfométrica ósea (BMP)**. (Gigli, et al., 2006).

Esteroidogénesis

La actividad esteroidogénica del folículo también depende de la acción de la FSH y LH sobre las células de la granulosa y de la teca, respectivamente. La proporción andrógenos-estrógenos en el líquido folicular refleja la integridad fisiológica y la viabilidad del folículo. Debido a que la FSH estimula principalmente las células de la granulosa y que la LH estimula la producción de testosterona por las células de la teca, la proporción de FSH-LH es un parámetro endocrino no importante para evaluar la producción ovárica de esteroides. (Hafez, 2002)

Las gonadotropinas y hormonas esteroides son de vital importancia en el control de la pauta cíclica del ovario y en el desarrollo folicular, esencial para la fertilidad. Los estrógenos, en particular, con su funcionamiento normal o no, reflejan la fertilidad o la infertilidad en los mamíferos. Con modelos en ratón se observó la disrupción de la codificación de los genes de receptores de estrógeno (ER α , ER β o ambos) o de la aromatasa, la enzima responsable de la síntesis de estrógenos, estos hallazgos han arrojado nueva luz sobre la acción de los estrógenos en la reproducción de los mamíferos. En particular, estos modelos mostraron, por primera vez, que los animales pueden responder a los estrógenos endógenos o exógenos. Aunque no son obligatorios para la supervivencia después del nacimiento o formación del aparato reproductor, los estrógenos han demostrado ser esenciales tanto para la fertilidad femenina como la masculina. (Findlay et al, 2009)

Crecimiento folicular durante las fases “folicular” y “de cuerpo amarillo”

La activación folicular se divide en dos etapas diferentes. La primera se denomina **activación inicial** y la segunda **activación de folículos antrales**. La inicial abarca la diferenciación de folículos primordiales hasta folículos terciarios, tanto la activación inicial como el crecimiento y va hasta la formación del antro gonadotrófico independiente, es decir que no depende de las concentraciones séricas de FSH y LH como se ha mencionado anteriormente. Aún no se ha podido determinar cuál o cuáles son los mecanismos que determinan el momento preciso en que un grupo de folículos primordiales comienzan a diferenciarse y a crecer. (Gigli, et al., 2006)

Durante una gran parte de la fase lutea en los ovarios están presentes cuerpos amarillos activos. Al parecer la fase folicular es corta. Sin embargo, la presencia de folículos antrales durante toda la fase de cuerpo amarillo sugiere que la duración real de la fase folicular es mayor de 2 a 5 días, si por “fase folicular” se entiende el periodo que va de la formación del folículo antral a la ovulación. (Hafez, 2002)

Existen algunas diferencias entre especie en cuanto a estas fases:

- a) Especies sin fase lutea, como roedores con ciclo estrual de cuatro días
- b) Primates con fases folicular y lutea bastante distintas
- c) Mamíferos domésticos con fase folicular y lutea superpuestas

En los mamíferos domésticos hay también un segundo ascenso de la FSH 20 a 30 horas después de la oleada preovulatoria de FSH y LH. Este incremento post ovulatorio en la hormona FSH desencadena la formación del antro en la población folicular, que incluye candidatos para ovular uno o dos ciclos después. Solo unos cuantos de estos folículos antrales diferenciados crecen hasta llegar a la ovulación; los demás sufren atresia y degeneran. (Hafez, 2002)

Los folículos preantrales pueden quedar retenidos en su crecimiento por largos períodos hasta que ocurre la segunda activación denominada **activación de folículos terciarios o antrales**. Esta segunda fase de activación tiene características muy diferentes a la primera ya que requiere niveles elevados de FSH. (Gigli, et al., 2006)

El cuerpo amarillo se desarrolla después del colapso del folículo en la ovulación. En la pared folicular interna se forman pliegues macroscópicos y microscópicos que penetran en la cavidad central. Tales pliegues consisten en un núcleo central de tejido de estroma y grandes vasos sanguíneos que se distienden. Las células se desarrollan pocos días antes de la ovulación y experimentan regresión con rapidez; a las 24 horas de la evolución todas las células de la teca restantes se encuentran en avanzado estado de degeneración. Tras la ovulación comienza la hipertrofia y luteinización de las células de la granulosa. La progesterona es secretada en forma de gránulos por las células luteínicas. (Hafez, 2002)

Estadio de proliferación. La capa granulosa muestra un aspecto semejante al que tenía anteriormente, durante la madurez del folículo. Está constituida por células que tienen escaso citoplasma y no se observan vasos en su interior. Llama la atención, en cambio, el engrosamiento de la teca interna, formada por células grandes, poliédricas, no abundante citoplasma, que contiene abundantes lipoides. La teca interna contiene igualmente abundantes vasos, el límite entre ambas capas es muy claro y en la luz del folículo colapsado no se observa sangre. (González & Merlo, 2006)

Estadio de vascularización. Se observa en este periodo la transformación de las células, que componen la capa primitiva de la granulosa, las cuales crecen, se hacen poliédricas y con abundante citoplasma. Estas células constituyen las típicas células luteínicas, que recuerdan en su morfología a las células epiteliales. Se observa igualmente en esta zona la penetración de los vasos, procedentes de la teca interna. En la luz de la formación, que describimos, aparece sangre en mayor o menor cantidad. Existen también penetraciones en forma de columnas de la teca interna en la capa de la granulosa luteinizada. Estas penetraciones tecales están constituidas por células voluminosas con abundante citoplasma, es decir, son células tecales que han sufrido también transformación luteínica. Estas penetraciones dan al cuerpo lúteo aspecto de guirnalda. Por el contrario, las células que componen la teca interna disminuyen de volumen, es decir, la transformación luteínica experimentada en la fase anterior se hace menos aparente. (González & Merlo, 2006)

Estadio de madurez. El cuerpo lúteo maduro destaca, habitualmente, sobre la superficie del ovario; tiene una forma más o menos esférica; cuyo diámetro oscila entre 1 y 2 cm y un color amarillento, como su nombre lo indica. Histológicamente está constituido, en su zona más periférica, por una delgada capa de células tecales. Por dentro de ellas, una gruesa capa de células luteínicas,

constituídas por numerosas hileras. Esta capa está parcialmente fragmentada por tabiques de células tecales que han sufrido una transformación luteínica más o menos intensa, es decir, son células cuyo citoplasma habitualmente es voluminoso. Estos tabiques se dirigen desde la periferia al centro, contienen vasos sanguíneos y dan al cuerpo lúteo un aspecto festoneado. En el centro de esta formación se observa habitualmente una capa de tejido conjuntivo laxo, pero en algunas ocasiones puede observarse líquido más o menos hemorrágico. (González & Merlo, 2006)

1.1.2 Maduración del óvulo

La maduración de los oocitos comprende dos etapas:

- a) Un periodo de crecimiento
- b) Un periodo final de preparación nuclear y citoplasmática, que constituye un prerrequisito para la fecundación y el desarrollo normales.

- a) Crecimiento del oocito

Cuando un folículo primordial es liberado de la reserva, comienza a crecer junto con el oocito. El crecimiento de este último es casi completo en el momento de la formación del antro. Mediante los procesos celulares, las células internas del cúmulo cooperan activamente para lograr el crecimiento del oocito, ya que establecen contacto estrecho con la membrana celular de este. Durante la formación de la membrana externa del oocito (zona pelúcida), se fortalecen las prolongaciones celulares del montículo ovárico. (Hafez, 2002)

La maduración de los oocitos es independiente de:

- La naturaleza de la estimulación folicular
- El diámetro del folículo del que se han originado
- La fuente del líquido folicular o su filtrado de diversos folículos y diferentes hembras

- b) Preparación del oocito para la fecundación

A partir de la ovogénesis, el núcleo del oocito diploténico permanece en la etapa de reposo llamada de núcleo reticular o dictiado. Normalmente nunca se reinicia la meiosis antes de la oleada ovulatoria de gonadotropina. La oleada ovulatoria de gonadotropinas suprime la producción del factor inhibidor de la meiosis de las células de la granulosa. Dicha oleada es seguida por la modificación metabólica de esa capa folicular. El reinicio de la meiosis es sólo un aspecto de maduración del ovulo; también debe ocurrir la maduración citoplasmática. (Hafez, 2002)

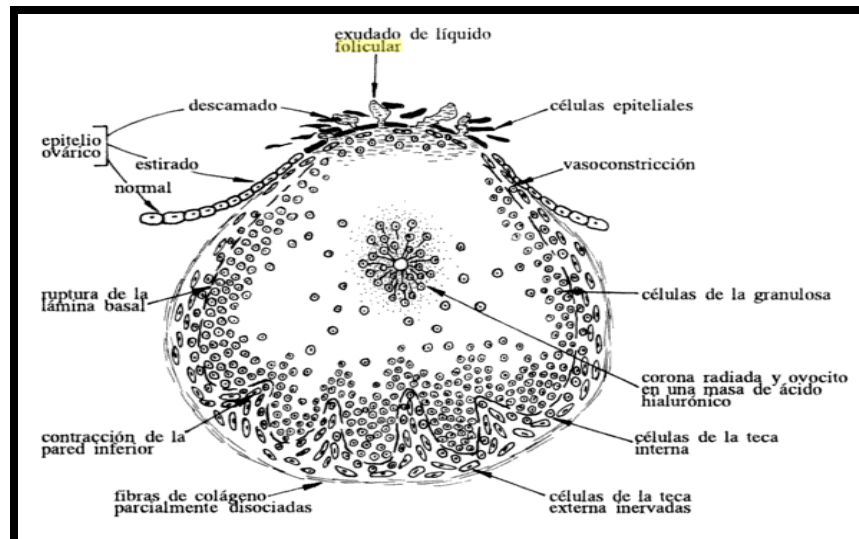
1.2 OVULACIÓN

Sucede entre 25 y 36 horas después del inicio de estro. Se refiere a la ruptura de la pared folicular y estructuras que la separan de la superficie ovárica, constituida por fibras del tejido conectivo. (Hernández et al., 2008)

Los folículos preovulatorios experimentan tres cambios principales durante el proceso ovulatorio (figura 4):

- Maduración citoplasmática y nuclear del oocito
- Pérdida de la cohesividad de las células del montículo ovárico entre las células de la capa granulosa
- Adelgazamiento y rotura de la pared folicular externa

Figura 4. Estado del folículo poco antes de la ovulación



Fuente: Principios de reproducción y alimentación (1995)

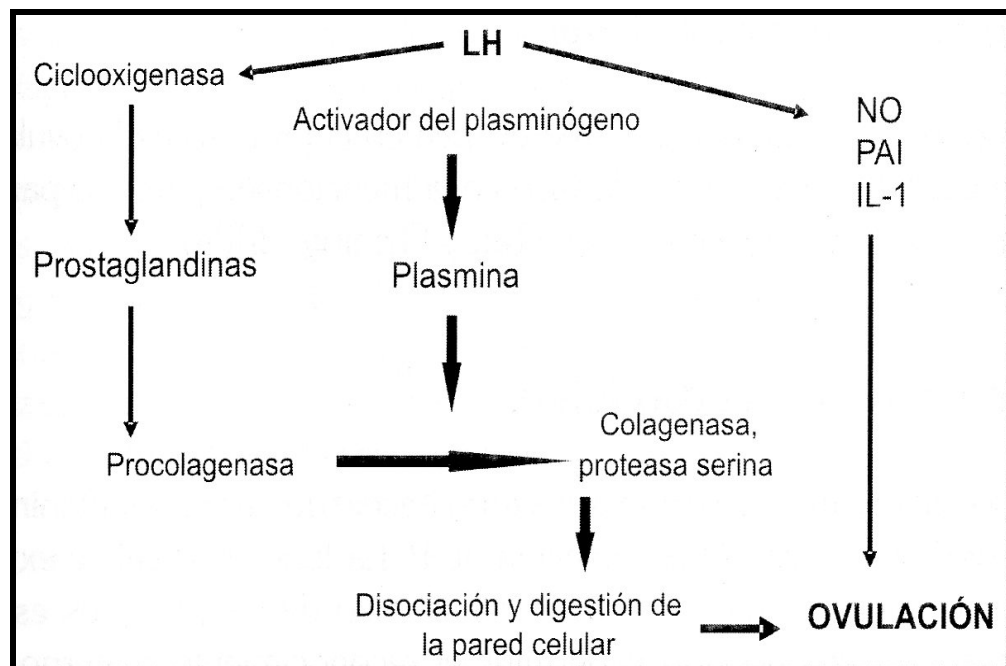
Acabado el crecimiento, el folículo maduro o de Graaf es capaz de responder ante la descarga preovulatoria de gonadotropinas (LH y en menor medida FSH), de tal forma que se produce una reestructuración completa del mismo y la subsiguiente liberación de un ovocito fértil a través de un pequeño orificio (estigma) producido en el punto de ruptura de su pared celular y de las capas celulares más superficiales de la corteza ovárica, cuyo grosor en este momento es muy reducido. (Buxadé & Angulo, 1995)

Antes de la ovulación hay aumento en el flujo sanguíneo hacia la zona del folículo ovulatorio en las paredes basales y laterales, con una disminución concomitante en el flujo hacia la parte apical. (Brannstromm y col., 1998 citado por: Hernández et al., 2008)

Las células foliculares de las zonas más internas, incluyendo las del cúmulo ovífero, tienen un ambiente hipóxico, el cual es propicio para la expresión del factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF). Éste se expresa antes de la ovulación y favorece, además de la proliferación de células endoteliales, la permeabilidad vascular. La difusión de agua en el antro folicular se hace más lentamente en las células foliculares que en el antro folicular, aumentando así el volumen folicular. Entonces, la expresión diferencial del VEGF, podría explicar, por lo menos en parte, los cambios vasculares y la dinámica de cambios volumétricos atinentes a la dehiscencia folicular. El VEGF está asociado a fenómenos de hipoxia debido a su localización en la pared interna que facilitan la permeabilidad hacia el antro folicular evitando la llegada del oxígeno a las células foliculares. (Shweiki y col., 1993; Neeman y col., 1997 citado por: Hernández et al., 2008)

Las prostaglandinas, los tromboxanos y leucotrienos son factores estimulados por la LH, que promueven la actividad del músculo liso de la pared folicular y la reacción vascular. La PGF_{2α} es esencial para la ovulación, pues los inhibidores de la ciclooxigenasa impiden la ovulación. Se ha demostrado que el uso de anti-prostaglandínicos que inhiben esta vía, afecta la ovulación pero no la suprime (Figura. 5). (Murdoch & Myers, 1983 citado por: Hernández et al., 2008)

Figura 5. Posibles mecanismos en la ovulación



NO: Oxido Nítrico; LH: Hormona luteinizante; TIMP: inhibidor de la metaloproteínas; PAI: Inhibidor del activador del plasminógeno.

Fuente: Reproducción en la Vaca Fisiología y Aplicaciones (2008)

En el momento de la ovulación tanto el líquido folicular como el ovocito son proyectados, entre otras causas, por la contracción de la musculatura lisa que rodea a los folículos hacia la cavidad peritoneal cayendo cerca de las fimbrias del oviducto. Esta expulsión, en el caso de las vacas y ovejas, se produce en forma de un flujo fluido. (Buxadé et al., 1995)

1.2.1 Mecanismos de ovulación

Se define como ovulación la culminación de una serie de mecanismos complejos desencadenados por la elevación de LH o LH- FSH según la especie, que como resultado, produce la expulsión del ovocito II del folículo preovulatorio. Los sucesos de ovulación abarcan cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos. Predecir el momento exacto de la ovulación es difícil y requiere práctica en la palpación y observación ultrasonográfica transrectal. (Gigli, et al., 2006)

La ovulación ocurre en respuesta a varios mecanismos fisiológicos, bioquímicos y biofísicos (Figura 6).

- a) Mecanismos neurobioquímicos y farmacológicos
- b) Procesos neuroendocrinos/endocrinos, GnRH, esteroides, y prostaglandinas
- c) Mecanismos neuromusculares y neurovasculares, así como interacciones enzimáticas

Las prostaglandinas pueden estimular las contracciones ováricas y activar los fibroblastos tecales para que proliferen y liberen enzimas proteolíticas que digieren la pared folicular y la lámina basal. También es posible que participen esteroides, especialmente la progesterona. (Gigli, et al., 2006)

- a) Mecanismos bioquímicos de la ovulación

La oleada preovulatoria de gonadotropina inicialmente induce un incremento inmediato y temporal en las concentraciones de esteroides debido a un aumento en la secreción de progesterona y progestinas relacionadas. Más tarde la secreción de estradiol y PGF2 también aumenta. La inhibición de la síntesis de prostaglandinas o de esteroides impide la ovulación. Si bien este mecanismo podría estar colaborando en la ovulación, no es la causa principal de expulsión del ovocito. Sin duda, la teoría que mejor explicaría los mecanismos involucrados en la ovulación es la **teoría bioquímica**, la cual pone en evidencia la importancia de las enzimas proteolíticas y los cambios vasculares cambios en la secreción de esteroides. (Gigli, et al., 2006)

El incremento en la secreción de esteroides y el cambio en la relación estradiol-progesterona que siguen a la oleada de gonadotropina se detectan fácilmente en el líquido folicular. La inhibición de la síntesis de progesterona impide la ovulación. La función de la progesterona es estimular la actividad de colagenasa en la pared folicular. (Hafez, 2002)

- b) Prostaglandinas

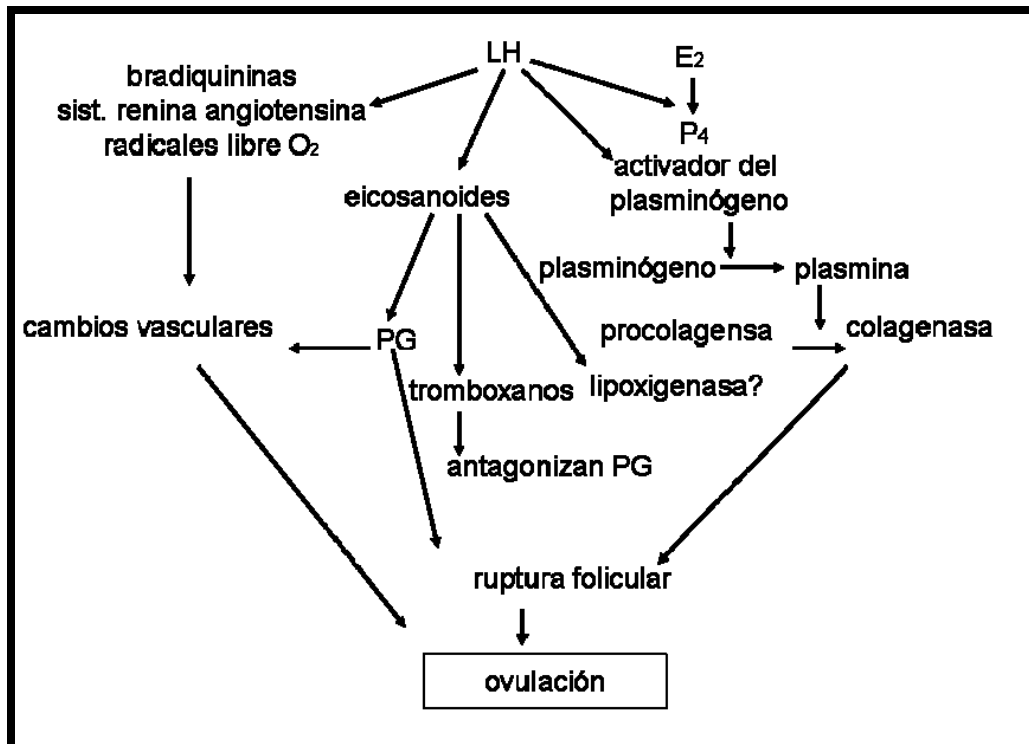
El aumento de las concentraciones de PGF2a y PGE2 en el líquido folicular no sigue de manera inmediata a la oleada de gonadotropina, como sucede con los esteroides. Cuando se inhibe la síntesis de prostaglandinas, el folículo permanece en el interior del folículo luteinizado o puede ser ovulado dentro del ovario- La PGF2a participa en la rotura folicular, y la PGE2 en la remodelación de las capas foliculares, que termina en la formación del cuerpo amarillo. (Hafez, 2002)

Las **prostaglandinas (PG), tromboxanos y lipoxidasas**, son ácidos grasos derivados del ácido araquidónico que pertenecen a los eicosanoides. Estas tres clases de eicosanoides intervienen en el proceso de la ovulación de diferente forma. La PGF₂α y PGE₂ intervienen en la ruptura de la pared folicular a través de la liberación de las enzimas contenidas en los lisosomas y en cambios vasculares. La administración de inhibidores de la síntesis de PGF₂α como la indometacina bloquea la ruptura de la pared folicular. Los tromboxanos aumentan su expresión en folículos preovulatorios. Su acción es antagónica al efecto producido por las prostaglandinas a nivel vascular, logrando que la ovulación sea un proceso autocontrolado. Las lipoxidasas medidas por radioinmunoensayos muestran un incremento como respuesta a la LH, pero la inhibición farmacológica de las mismas facilita el proceso de ovulación. Queda aún por determinar la función de las mismas. (Gigli, et al., 2006)

c) Mecanismos neuromusculares

El estroma ovárico y las capas concéntricas de la teca externa de los folículos preovulatorios contienen células de musculo liso ricamente innervadas por terminaciones nerviosas autónomas. Las contracciones ováricas facilitan la rotura folicular después de que se ha adelgazado el ápice del folículo. Antes de la rotura, el folículo por sí mismo no se contrae de manera espontánea. Después de la rotura folicular el sistema neuromuscular tecal, estimulado por PGF₂a contribuye a la extrusión del oocito. (Gigli, et al., 2006)

Figura 6. Esquema de los mecanismos propuestos durante la ovulación



Fuente: Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos (2006)

1.2.2 Fenómenos celulares

Varias capas de tejido separan el oocito del exterior del folículo: epitelio superficial, túnica albugínea, rica en colágeno, teca externa, membrana basal y la misma membrana granulosa. Antes de la ovulación todas las capas tisulares se desintegran. Además, el incremento necesario en la elasticidad folicular durante el crecimiento preovulatorio se asocia a cambios en las relaciones entre células de la granulosa y de la teca. Tales cambios son también un prerrequisito para la mayor organización del cuerpo amarillo. (Hafez, 2002)

Cuando el folículo en crecimiento comienza a hacer protrusión en la superficie ovárica, su vascularidad superficial aumenta excepto en su centro, que aparece desprovisto de vasos sanguíneos. Esta zona avascular es el punto futuro de rotura.

- **Oocito:** Sólo las células del montículo ancladas en la zona pelúcida permanecen, rodeando al oocito y formando la corona radiada. La disociación de las células del cúmulo libera al oocito de la capa granulosa, y la meiosis se reanuda unas 3 horas después de la oleada de las gonadotropinas. Las células del montículo ovárico secretan activamente glucoproteínas, las cuales forman una masa viscosa se dispersa en la superficie ovárica para facilitar la recepción de los oocitos de las fimbrias. Se utiliza ampliamente la ultrasonografía para recuperar óvulos preovulatorios del folículo ovárico y emplearlos en la fecundación in vitro.
- **Células de la Granulosa:** La capa granulosa se disocia por completo sólo en el ápice folicular y finalmente desaparece. Unas dos horas antes de la ovulación, las prolongaciones en crecimiento de las células de la granulosa han penetrado a través de la lámina basal, preparando la invasión de las células de la teca y vasos sanguíneos a la granulosa después de la ovulación en el cuerpo amarillo en desarrollo. Este proceso está relacionado con la producción del factor de preñez temprana.
- **Células de la Teca:** El volumen folicular aumenta rápidamente en las pocas horas que preceden a la ovulación, sin incremento alguno en la presión del líquido folicular, debido a la mayor elasticidad del folículo. Esto es consecuencia de una pérdida de cohesión de las células de la teca externa a causa de edema invasivo de esta capa y de la disociación de las fibras de colágena, que comienza 4 horas después del coito.
- **Cambios en el ápice:** La rotura del folículo implica la interacción entre el epitelio ovárico y la pared folicular subyacente. La pared del ápice folicular se vuelve extremadamente delgada en una zona que recibe el nombre de "stigma", la cual hace protrusión en la superficie del ovario y se torna avascular por completo. Durante la ovulación, el estigma saliente se rompe en el ápice y libera parte del líquido folicular y la masa viscosa de glucoproteína que rodea el oocito. (Buxadé et al., 1995)

1.2.3 Regulación de la progesterona síntesis y acción en el cuerpo lúteo bovino

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula endocrina transitoria formada por las células secretoras del folículo tras la ovulación. La función principal de CL es la producción de progesterona (P4), que regula diversas funciones de la reproducción. La progesterona juega un papel clave en la regulación de la duración del ciclo estral y en la implantación del blastocisto. El aumento preovulatorio de LH es

crucial para la luteinización folicular de células y el mantenimiento del CL, sin embargo, el CL es menos dependiente de la estimulación de la LH durante la fase lútea temprana. Desde el principio, el CL requiere el apoyo luteotrópico para su crecimiento y desarrollo, los otros factores apoyan la función de la LH para mantener el desarrollo y funcionamiento del CL. De hecho, se constató que, las prostaglandinas (PG) I₂ y E₂, la oxitocina, noradrenalina y los factores de crecimiento estimulan de manera eficiente la síntesis de progesterona en el CL temprano bovino. (Niswender & Col., 2000, citado por: Rekawiecki, 2008)

1.2.3.1 Regulación molecular de la síntesis de progesterona en CL

El colesterol, que puede obtenerse de la dieta o ser sintetizado y transportado a los ovarios las lipoproteínas (HDL y LDL) es un precursor de la síntesis de esteroides. La progesterona, entre otras hormonas esteroides es el regulador fisiológico más importante implicado en la vida del CL y la implantación del blastocisto. La esteroidogénesis ovárica está regulada por varios factores que juegan el papel de modulador durante el ciclo estral. (Rekawiecki, 2008)

El primer paso de la esteroidogénesis se produce en la mitocondria. El transporte del colesterol en la mitocondria es un paso limitado en la síntesis de P₄. La proteína que es la máxima responsable del transporte de colesterol desde el exterior al interior de la membrana mitocondrial es la proteína esteroidogénica reguladora aguda (StAR). Esta es sintetizada como una proteína de 37 kDa como precursor y procesado a 30 kDa como proteína madura después de cruzar la membrana mitocondrial. La interacción de StAR con el exterior de la membrana mitocondrial resulta en un cambio conformacional de proteínas y crea una StAR's vinculante al colesterol. Además de STAR, periféricas y de los receptores de la benzodiazepina, el ligando natural de este receptor también parece estar involucrado en la regulación de la tasa de transporte de colesterol. La membrana interna mitocondrial está relacionada con el citocromo P450_{scc}, que es el primer componente de la enzima compleja que se une a la cadena de colesterol para formar pregnenolona. Posteriormente, se convierte en pregnenolona P₄ por 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa / isomerasa (3 β -HSD), asociado con el retículo endoplasmático liso. La hormona luteinizante (LH) es aceptada como el regulador más importante de la esteroidogénesis luteal, aunque este proceso también está regulado por otros factores luteotrópicos. Los receptores de membrana de LH se encuentran principalmente en las células lúteas pequeñas. La unión de LH a su receptor, activa al cAMP-dependiente de la activación de la proteína kinasa A (PKA) y aumenta la producción de P₄. La cantidad de receptores para LH varía en el curso del ciclo estral. Es bajo en los primeros y últimos días del ciclo estral y alto a mediados del ciclo. (Niswender, 2002, Cameron & Stouffer, 1982, citado por: Rekawiecki, 2008)

1.2.3.2 Participación del sistema noradrenérgico en la esteroidogénesis ovárica

Los ovarios bovinos están inervados por los nervios adrenérgicos, que dan un soporte esencial, a la esteroidogénesis en las células de la granulosa y lúteas. La denervación de los ovarios reduce la secreción de esteroides ováricos. La concentración lútea de noradrenalina (NA) y su precursor la dopamina (DA) varía en toda la fase lútea, cuando el CL puede sintetizar NA a partir de DA. La mayor cantidad de DA y NA se encuentran en el CL temprano, pero disminuyen en el CL mediano y de nuevo aumentan en los últimos días del mismo. Sin embargo, las concentraciones de beta-receptor, en el CL de animales bovinos han correlacionado altamente con las concentraciones

plasmáticas de P4 en el transcurso del ciclo estral. El estímulo del β -receptor en el ovario de las vacas por infusión de NA, que imita en corto plazo el estrés, aumenta la P4 y la secreción ovárica de OT en pocos minutos. Además, se estimula la actividad de NA 3 β -HSD y citocromo P450_{scc} y peptidil-glicina amida mono-oxigenasa (PGA). La PGA es una enzima esencial involucrada en el proceso de post-transcripción en la síntesis de OT. Al mismo tiempo, la P4 reduce su actividad por acción de las enzimas mono-amino-oxidasa y la catecol-O-metil transferasa, principales responsables de la degradación intracelular de una de las catecolaminas. Así de esta manera, la P4 prolonga la vida media de la NA y la duración de la influencia estimulante sobre la síntesis de P4. El esquema de participación de algunas hormonas en la función de la célula lútea se presenta en la (figura 7). (Rekawiecki, 2008)

Figura 7. Hormonas en la función de la célula lútea

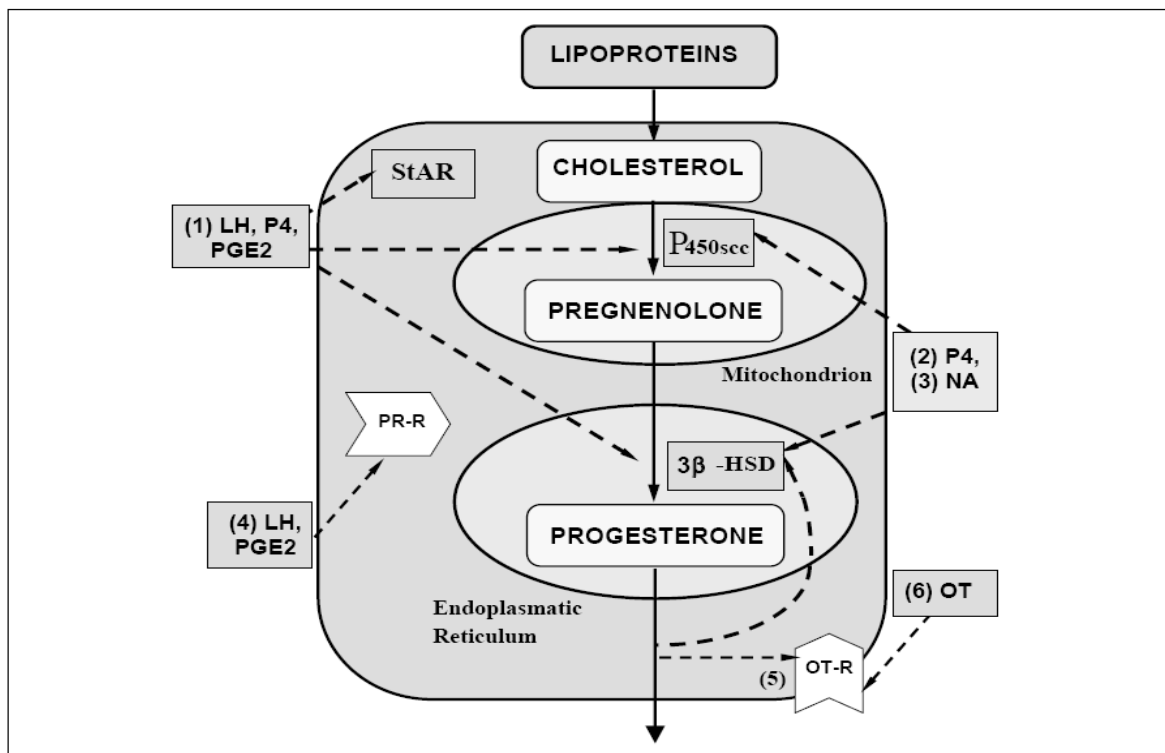


Fig. 1. Molecular regulation of progesterone synthesis in the bovine luteal cell. LH, P4, PGE₂ increase the gene expression of StAR, cytochrome P450_{scc} and 3 β -HSD, which are crucial enzymes of steroidogenesis (1). Progesterone influences on its own synthesis by increasing of P450_{scc} and 3 β -HSD activity (2). Even though noradrenaline (NA) stimulates progesterone secretion and increases P450_{scc} and 3 β -HSD activity (3) it does not affect gene expression of these enzymes. LH and PGE₂ (on days 6-10 of the estrous cycle) increases of gene expression of PR-R (4). P4 increases protein level for OT-R only on days 6-10 (5), while OT stimulates of its own gene expression on days 11-16 (6).

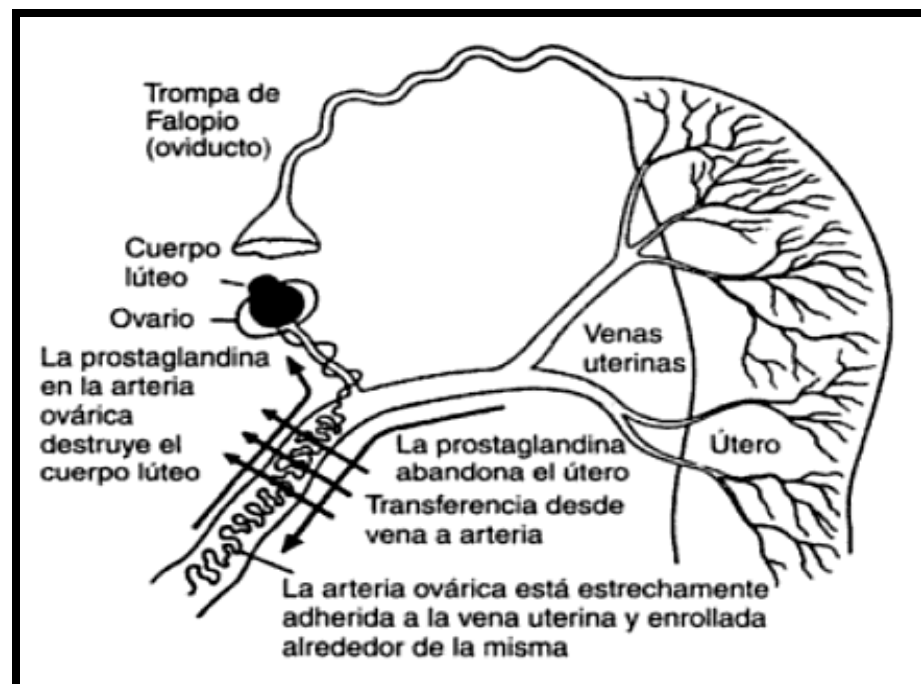
Fuente: Regulation Of Progesterone Synthesis And Action In Bovine Corpus Luteum (2008)

La noradrenalina también puede interactuar en el CL de los bovinos con el óxido nítrico (NO), que participa en la modulación de la producción y la síntesis de NA en tejido vascular. (Rekawiecki et al., 2008)

1.2.4 Regresión luteal (lúteolisis)

La regresión del cuerpo lúteo es importante en los grandes animales domésticos no gestantes para que puedan entrar de nuevo en un estado potencialmente fértil tan pronto como sea posible. La duración del CL después de la ovulación debe ser la suficiente como para permitir la síntesis y liberación, en una gestación incipiente y en desarrollo, de factores que permitan su mantenimiento y sin embargo, lo bastante corta para que un animal no gestante pueda retornar lo antes posible a un estado fértil. En los grandes animales domésticos, la fase luteínica dura alrededor de 14 días en ausencia de gestación, lo que permite a estos animales completar ciclos a intervalos relativamente frecuentes (es decir aproximadamente cada 3 semanas). (Cunningham, 2003)

Figura 8. Ruta postulada mediante la cual la $PGF_{2\alpha}$ ejerce su efecto sobre el cuerpo lúteo



Fuente: Fisiología Veterinaria (2003)

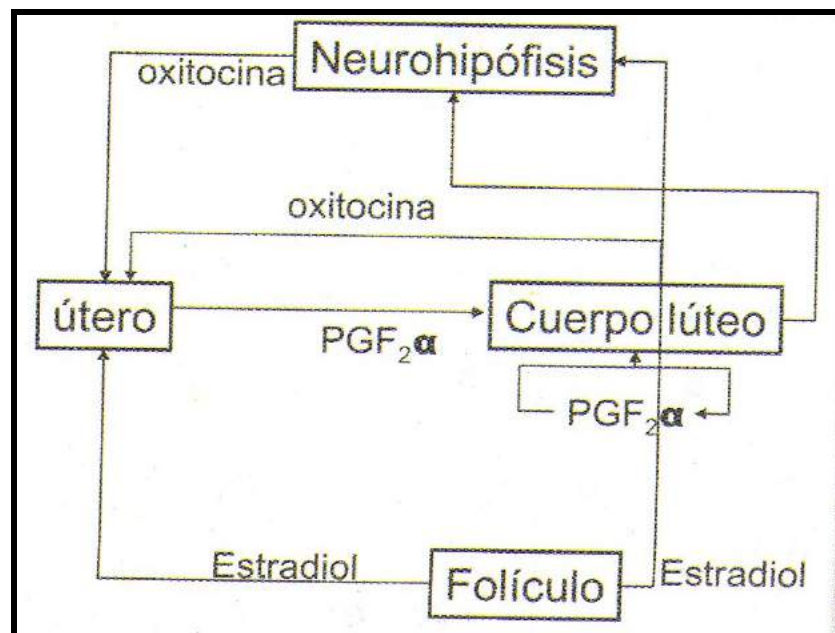
En la actualidad se acepta que la $PGF_{2\alpha}$, un ácido graso insaturado de 20 átomos de carbono, es la sustancia uterina que induce la regresión del CL en animales domésticos, incluidos vacas, yeguas, cerdas y ovejas, aunque no desempeña un papel natural conocido en perras, gatas o primates. La $PGF_{2\alpha}$ y la prostaglandina E se han utilizado como tratamiento clínico para inducir lúteolisis en perras y leonas para tratar piómetras o para inducir abortos. En animales domésticos de gran tamaño, la regresión del CL se inicia gracias a la síntesis uterina y posterior liberación de $PGF_{2\alpha}$

(probablemente de origen endometrial) alrededor de 14 días después de la ovulación, cuyo paso del útero al ovario se piensa que se produce a través de una transferencia contracorriente a nivel local o mediante transferencia sistémica general (Figura 8). (Cunningham, 2003)

Los niveles detectables de progesterona en la sangre o en la leche, aumentan progresivamente con el desarrollo del CL durante el ciclo estral. Si el reconocimiento materno de la gestación no sucede en el día 16, tales niveles comienzan a disminuir para permitir el inicio de un nuevo ciclo. Este descenso de la progesterona se debe a la acción sobre el ovario de la $PGF_{2\alpha}$ secretada por el útero. Su efecto parece ser local, ya que la remoción del cuerno uterino ipsilateral al CL evita la regresión luteal, pero no sucede así si el cuerno que se remueve es el contralateral. Se cree que el transporte de la $PGF_{2\alpha}$, del útero hacia el CL, se hace desde las venas uterinas hacia la arteria ovárica por un mecanismo de contracorriente. La $PGF_{2\alpha}$ se libera en una serie de 5 a 8 pulsos, los cuales ocurren a intervalos de 6^a 8 horas y comienzan inmediatamente antes de la regresión luteal. (Convey & Hansel, 1983, Citado Por: Hernández et al., 2008)

La síntesis de $PGF_{2\alpha}$ por el endometrio es máxima al momento de la lúteolisis. Este proceso se inicia hacia el día 11-13 en el ovino y hacia el día 16-17 en el bovino, porcinos y equinos. La secreción de esta hormona se realiza en pulsos pequeños cuya intensidad va aumentando a medida que avanza el proceso lúteolítico. El efecto de la PG sobre el CL es múltiple. Sobre las células luteales grandes, la PG estimula la Exocitosis de los gránulos citoplasmáticos que contienen grandes cantidades de oxitocina (Ox). Las células luteales sintetizan $PGF_{2\alpha}$, posiblemente por estímulo de la $PGF_{2\alpha}$ endometrial (Figura 9). (Mann & Lamming, 2006, citado por: Hernández et al., 2008)

Figura 9. Mecanismo hormonal desencadenado durante el proceso de lúteolisis.



Fuente. Reproducción en la Vaca Fisiología y Aplicaciones (2008)

Ha sido bien documentado que las dietas grasas y los ácidos grasos mejoran la reproducción en las vacas lecheras. En ese sentido, la inclusión de ácidos grasos poliinsaturados de la familia omega-3 (por ejemplo, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico) de origen marinos, en raciones de vacas lecheras ha suprimido la producción de prostaglandina (PGF) F2 α , retrasa la regresión lútea y mejora la tasa de concepción. (Staples & Thatcher, 1998, citado por: Thangavelu & col, 2007)

1.3 OVIDUCTO

En mamíferos la fecundación ocurre en el oviducto de los genitales femeninos. El oviducto y el líquido contenido forman un entorno beneficioso para la maduración de gametos, el transporte de gametos, fertilización y desarrollo precoz de los embriones. Estos eventos son procesos claves en la reproducción de los mamíferos que se encuentran bajo el control de las hormonas, por ejemplo, esteroides y las prostaglandinas (PG). (Gabler et al, 2008)

Los Oviductos presentan varias regiones estructuralmente distintas, al observarlos bajo el microscopio. La porción más baja, la más cercana al útero, es llamada Istmo. La conexión entre el útero y el Istmo, es llamada Unión útero-tubal (UUT). La UUT sirve como filtro de espermatozoides anormales y es el reservorio de espermias hábiles (Figura 10). Las investigaciones han sugerido que cuando los espermatozoides llegan al Istmo, estos se adhieren a las paredes. Durante este periodo de adherencia, ocurren muchos cambios fisiológicos a las paredes espermáticas, los cuales son esenciales para que los espermias puedan fertilizar el óvulo. Estos cambios son colectivamente llamados Capacitación, y son aparentemente regulados por esta importante adherencia a las paredes del Istmo. Tarda aproximadamente cinco a seis horas, a partir del momento de la inseminación, para que en el Istmo haya una población espermática capacitada para ejercer la fertilización. La porción más alta del Oviducto, cercana al Ovario, es llamada Ámpula. El diámetro interno del Ámpula, adecuado para el paso del óvulo, es mayor que el del Istmo. Es en este segmento del Oviducto donde ocurre la fertilización. Se cree que una señal química, realizada al momento de la ovulación, es la que estimula la liberación de los espermatozoides de las paredes del Istmo, permitiéndoles continuar su viaje al sitio de la fertilización en el Ámpula. La estructura en forma de embudo al final del Oviducto, llamado Infundíbulo, rodea los ovarios y cosecha los huevos, evitando que éstos caigan a la cavidad abdominal (Figura 11). Estructuras vellosas sobre el infundíbulo y dentro del Ámpula, se mueven rítmicamente para transportar el óvulo y su masa de células, a través del Oviducto hasta el sitio de la fertilización. (DeJarnette & Nebel, 2007)

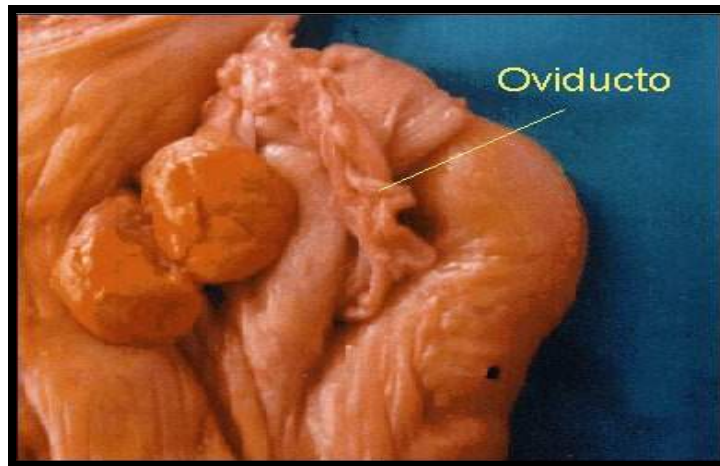
Figura 10. La Unión Útero-Tubal, el Istmo y el Ámpula



Fuente: Anatomía y Fisiología de la Reproducción Bovina (2007)

En el bovino, el principal aporte sanguíneo del oviducto proviene de la rama tubárica de la arteria ovárica y de ramas provenientes de la anastomosis entre la rama uterina de la arteria ovárica y la arteria uterina, garantizando un aporte sanguíneo adecuado al ovario y al oviducto, aun cuando se produzca la sección quirúrgica de la arteria ovárica. Otros investigadores reportan en el bovino interconexiones en forma de arcos anastomóticos entre la rama uterina de la arteria ovárica y la rama tubárica del mismo vaso que suple el oviducto, caudal y cranealmente en toda su extensión. En la oveja el principal aporte sanguíneo el oviducto es suministrado por la rama tubárica de la arteria ovárica. (Perozo et al., 2006)

Figura 11 Oviducto de la vaca.



Fuente www.inea.uva.es/.../ap_reproduc_oviducto.htm

1.3.1 Mucosa del oviducto

La mucosa del oviducto está constituida por pliegues primarios, secundarios y terciarios. La ampolla está dispuesta en pliegues elevados y ramificados cuya altura disminuye hacia el istmo y que se convierten en bordes bajos en la unión uterotubárica. La compleja configuración de estos pliegues mucosos en la ampolla llena casi por completo la luz, de modo que sólo hay un espacio potencial. El contenido de líquido es mínimo, por lo que la masa de células foliculares del montículo ovárico (cúmulo oóforo) está en íntimo contacto con la mucosa ciliada. La mucosa consiste en una capa de células epiteliales cilíndricas. El epitelio contiene células ciliadas y no ciliadas. (Hafez, 2002)

La integridad de la mucosa en el revestimiento del tracto reproductivo femenino es importante para su función fisiológica y su defensa. (Gabler et al 2008)

El oviducto se considera bajo la influencia de hormonas incluido el estradiol. Su sensibilidad hacia estas moléculas debe ser mediada por la presencia de sus receptores específicos. Se han detectado en el oviducto bovino ARNm y proteínas, tanto para los receptores de estradiol, los receptores de estrógenos alfa ($ER\alpha$) y beta ($ER\beta$). Con ayuda de la inmunohistoquímica se reveló la presencia de ambos receptores en las células epiteliales luminales, que se supone son responsables de tomar

parte en la comunicación entre el oviducto y los gametos o el embrión. (Ulbrich & Col., 2003, citado por: Gabler & Col., 2008)

Por lo tanto, todos estos resultados indican que una vía de transducción de señales está presente en el oviducto de la especie bovina: empezando por el aumento de las concentraciones de estradiol en el oviducto, la unión a su receptor da como resultado la señalización de la cascada por activación de NF- κ B, dando lugar a un aumento de la conversión de ácido araquidónico, que finalmente resulta en PGE2. Esta vía ha demostrado ser responsable de un aumento del movimiento de los cilios y la regulación de la contracción muscular para garantizar la motilidad del oviducto. (Wijayagunawardane & Col., 2001, citado por: Gabler et al, 2008)

2. FECUNDACIÓN Y SEGMENTACIÓN

La gestación es un estado fisiológico de la hembra mamífera en el cual se realiza el desarrollo del nuevo ser. Comprende un periodo desde la fertilización hasta el parto, la fertilización en mamíferos representa el inicio de una nueva vida. Para que se lleve a cabo es necesario que tanto el espermatozoide como el óvulo estén maduros y se encuentren de forma sincronizada. (González, 2002)

Es difícil precisar en qué momento se inicia exactamente la gestación pero se asume que es a partir de la unión del espermatozoide con el óvulo eclosionado y alojado en el infundíbulo salpingiano mediante una serie de procesos fisicoquímicos de ambos gametos. Tras la concepción se restaura el número de cromosomas a la dotación completa. Los gametos masculino y femenino poseen 30 cromosomas cada uno y al unirse (singamia) forman una célula de características diploides con la dotación completa de cromosomas. (Schroeder, 1999)

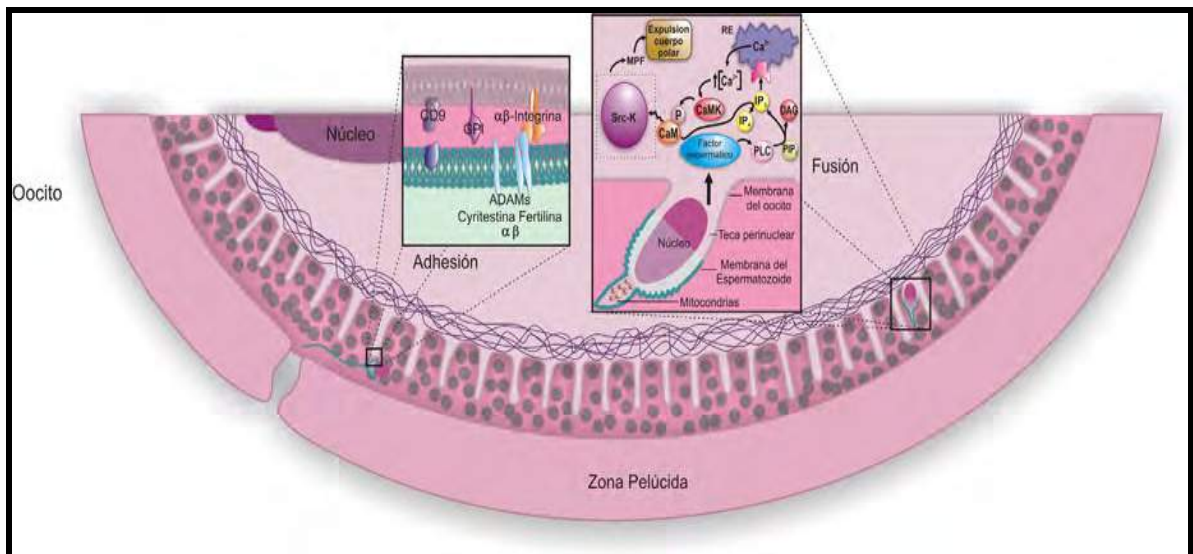
La interacción del espermatozoide y del huevo inicia una serie de transformaciones que involucran a los componentes nucleares y citoplásmicos de ambos gametos. Estas transformaciones constituyen el proceso de fertilización, que comienza con la interacción y subsecuente fusión de los gametos y termina con la asociación de los grupos correspondientes de cromosomas derivados de los dos pronúcleos, uno de origen materno y el otro paterno. (Galina, 2006)

2.1 INTERACCIÓN DEL ESPERMATOZOIDE Y EL ÓVULO

Del eyaculado depositado dentro del tracto reproductivo, solamente un pequeño grupo de espermatozoides capacitados alcanzan el ovocito después de pasar a través del ``cumulus oophorus`` formado principalmente por las células de la granulosa y ácido hialurónico. Este último paso se logra gracias a la motilidad hiperactivada adquirida durante la capacitación y por la acción de la proteína PH-20 localizada en la membrana plasmática del espermatozoide que posee un dominio con actividad hialuronidasa. (Velásquez, 2004)

Una vez que el espermatozoide alcanza el espacio perivitelino, se produce la adherencia (Figura 12) entre la membrana plasmática de la zona ecuatorial espermática y las microvellosidades de la membrana citoplásmica del oocito luego se fusionan las dos membranas (Figura 12) y de esta manera el núcleo y demás organelas de la célula espermática ingresan al ooplasma del oocito. (Olivera & col, 2006)

Figura 12. Fertilización: adhesión y fusión.



Fuente El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización, Rev Col Cienc Pec Vol. 19:4, 2006

2.2 PERIODO OVULAR

El periodo ovular se extiende desde la fecundación o fertilización (anfimixis y singamia) hasta el doceavo día de gestación. Recibe el nombre de periodo ovular porque durante la mayor parte de esta fase el cigoto (huevo fecundado) conserva su estado original, salvo que el número de células en división mitótica ha llegado a 16. El periodo de fecundación se lleva a cabo primero en el oviducto (fase oviductal) y luego uterina. El periodo ovular comprende básicamente fertilización, transporte oviductal, flotamiento intrauterino y sujeción endometrial. (Schroeder, 1999)

2.2.1 Fertilización

Ciertos ácidos grasos (AG) tienen efectos específicos sobre diferentes tejidos, con posibles beneficios para la fertilidad de vacas lecheras. Estos beneficios parecen ser independientes de la disposición de las calorías y los cambios en el estado energético de la vaca (Staples, 1998 & Santos, 2008, citado por: Cerri et al, 2009).

Por lo tanto, es posible especular que el aumento en la ingesta de ácido linoleico podría afectar a la composición de ácidos grasos de los tejidos reproductivos y a su vez, mejorar la tasa de fecundación y desarrollo embrionario. Esto podría explicar la mejora de preñez por inseminación artificial, observado en vacas lecheras alimentadas con ácidos grasos insaturados (Juchem, 2008 citado por: Cerri et al., 2009).

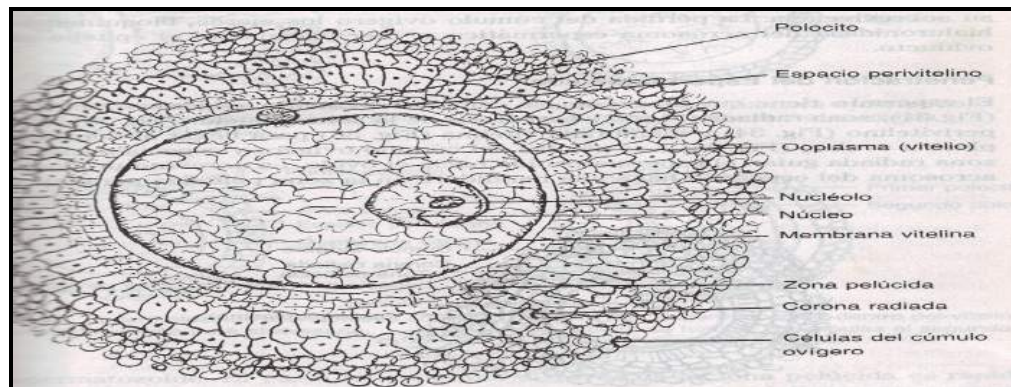
La fertilidad de la vaca lechera es ya de por sí pobre: en primer lugar la tasa de concepción en la mayoría de los rebaños está por debajo del 50%. Además, ha sido una constante tendencia a la baja

en las tasas de concepción en algunos países en los últimos 30 años, junto con el aumento de producción de leche (Lamming, 1998 citado por: Cerri et al., 2009).

En mamíferos la interacción de los espermatozoides con el óvulo se da en tres niveles, en primer lugar con las dos envolturas extracelulares alrededor del óvulo y finalmente con la membrana plasmática del óvulo. La creación de embriones es el resultado de la adhesión de la membrana gametos y la posterior fusión. (Janice, 2009)

Después de la ovulación, el óvulo en el estado de primer cuerpo polar, envuelto en su corona radiada y líquido folicular, cae en el infundíbulo del oviducto donde se realiza la concepción (Figura 13). El óvulo recién eclosionado del folículo continúa rodeado por el cumulus oophorus; las células del cúmulo ovígeno desaparecen rápidamente mediante procesos autolíticos y presencia de bicarbonato en las secreciones del oviducto. No se requiere un proceso completo de denudación del óvulo para que penetre el espermatozoide previamente capacitado. La denudación del óvulo se debe a la hialuronidasa presente en el acrosoma del espermatozoide, desdoblando el ácido hialurónico, componente del cemento celular del cúmulo ovígeno en partes equimoleculares por N-acetilglucosamina y ácido glucorónico. (Schroeder, 1999)

Figura 13 Óvulo recién eclosionado



Fuente Fisiopatología Reproductiva de la Vaca (1999)

2.2.2 Denudación del óvulo eclosionado

La denudación del óvulo hacia la zona pelúcida se debe primordialmente a la hialuronidasa presente en el acrosoma del espermatozoide. La denudación del óvulo fecundado es importante para que este último realice los intercambios gaseosos y metabólicos necesarios para su sobrevivencia. La liberación gradual de las proteínas de la matriz acrosomal, que incluyen las proteínas de unión a ZP e hidrolasas en la zona, se produce en los márgenes exteriores de esta estructura y las proteínas recién liberadas participan en las rondas posteriores de unión y liberación, permitiendo que los espermatozoides incrementen su movilidad, para que sigan su camino a través de la zona. (Buffone et al, 2009)

Una vez que el contacto inicial con la ZP se hace a través de la punta apical, el movimiento de los espermatozoides hace que la región posterior de la cabeza del espermatozoide entre en contacto con la zona en la superficie. La unión de la cabeza del espermatozoide a la zona pelúcida es regulada por sitios receptores en la superficie de ésta. El tratamiento de óvulos con anticuerpos anti zona pelúcida o la enzima proteolítica tripsina bloquea la unión de espermatozoides. Dicha unión también puede ser inhibida por pretratamiento de los espermatozoides con anticuerpos antiespermatozoide o con glucoproteínas extraídas de la zona pelúcida. Por, tanto los anticuerpos antiespermatozoide o la zona pelúcida bloquean o enmascaran los sitios receptores para gametos masculinos en las superficies de la zona pelúcida y del espermatozoide. (Buffone et al, 2009)

2.2.2.1 Posibles receptores en la membrana del espermatozoide y la zona pelúcida

Después de haber atravesado el *cumulus oophorus* el espermatozoide con acrosoma intacto se dispone a unirse a la zona pelúcida (ZP). Inicialmente la adhesión del espermatozoide es mediada por la glicoproteína ZPC y/o ZPB (receptor primario), que une a receptores de la parte anterior de la cabeza del espermatozoide con acrosoma intacto. Esta unión se conoce como reconocimiento primario o unión primaria. La unión del espermatozoide a la ZP de ratón está basada en procesos de reconocimiento proteínas-carbohidratos y asociación de oligosacáridos O-unidos desde la ZP3 (ZPC) con relación receptor- espermatozoide. En la actualidad se sugiere que podrían estar implicadas diferentes proteínas al mismo tiempo formando un complejo multiproteico. Lo que sí se sabe es que estas proteínas espermáticas serían del tipo lectina o enzima que reconocerían azúcares de la glicoproteína ZP3. (Velásquez, 2004)

- a) **B1,4-Galactosiltransferasa (GalT)** identificada en vaca y ratón, la enzima GalT es una candidata a receptor de zona. Su característica principal es que adiciona galactosa a glicoproteínas y glicopéptidos con residuos terminales N-acetilglucosamina. Como moléculas de la membrana plasmática, GalT-1 puede actuar como receptor para glicoproteínas específicas, incluyendo la ZP3. La GalT-1 como receptor de la zona se ha encontrado en la región acrosomal del espermatozoide y se ha descrito en toro, cerdo, conejos, caballo y rata. La ZP3 como receptor está relacionada con la GalT-1 del espermatozoide.
- b) La **LZRK (receptor de ZP)** es una proteína de 95 kDa identificada en ratón.
- c) La **SP56**, identificada en ratón, se encuentra en la superficie como proteína de 62 kDa. Su aislamiento está basado en la afinidad por la ZP3 y los residuos de α -galactosa.
- d) Las **espermadhesinas** son una familia de proteínas de adhesión espermática de bajo peso molecular (12 – 16 kDa) caracterizada principalmente en cerdo que reconoce a las glicoproteínas de la ZP.
- e) Las **zonadhesinas** son proteínas de la membrana periférica y su aislamiento está dado por su afinidad a la ZP.
- f) **SED1 (p47)** ha sido primeramente descrita en el espermatozoide de cerdo y recientemente también en el ratón como una proteína que participa en el reconocimiento y unión del espermatozoide a la ZP. Parece que esta proteína del espermatozoide tiene la capacidad de unirse a la glicoproteína ZP2 y ZP3 al menos en el ratón. (Velásquez, 2004)

La composición básica e la ZP es de glicoproteínas sulfatadas, que tienen una proporción aproximada de 71% proteínas, 19% hexosas, 2,7% de ácido siálico y 2,4% de sulfatos. Existen por lo menos tres familias de glicoproteínas de ZP, la ZP1, ZP2 y ZP3, cuyos pesos moleculares varían considerablemente con la especie. (González, 2002)

La glicoproteína mZP2 en ratón t la bZP2 en vaca están involucradas en la unión secundaria como segundo receptor a través de su interacción con componentes intra acrosomales (acrosoma reaccionado), muy posible por acción de la enzima proacrosina, que se encuentra en la membrana acrosomal interna (Tabla 3). (Velásquez, 2004)

Una publicación de mediados de 1990 plantea la posibilidad de que la familia de las integrinas, moléculas de adhesión celular, podrían estar involucradas en esta interacción de gametos y el paso del espermatozoide por la membrana en la fertilización de los mamíferos. (Takada & Simon, 2007, citado por: Janice, 2009)

Se pensaba que la $\beta 1$ integrina en el óvulo era un receptor para el espermatozoide, en el espermatozoide los principales candidatos eran los miembros de la familia A Desintegrina y A Metaloproteasa (ADAM). (Almeida & Col., 1995; Evans & Schultz 1997, citado por: Janice, 2009)

Sin embargo, un informe de 2003 planteó dudas con respecto a este modelo, con la demostración de que los oocitos de ratones que carecen de la subunidad $\beta 1$ integrina son fértiles y los oocitos deficientes de $\beta 1$ son capaces de ser fecundados. (He & Col., 2003, citado por: Janice, 2009)

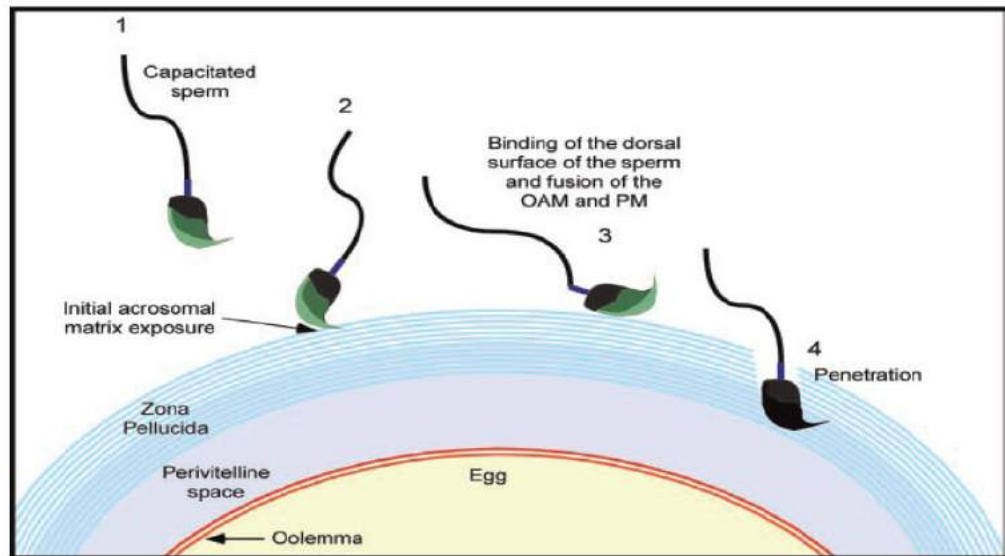
2.2.3 Penetración del espermatozoide

El espermatozoide tiene que atravesar las células del cúmulo ovífero en desintegración, la corona radiada, las células de la zona pelúcida, el espacio perivitelino y membrana vitelina para llegar al ooplasma (citoplasma celular). Las células del cúmulo ovífero y especialmente las de la corona radiada guían al espermatozoide hacia el óvulo. La acrosina producida en el acrosoma del espermatozoide hace una hendidura en la zona pelúcida para que penetre por espacio de 30 minutos. (Schroeder, 1999)

Para los espermatozoides depositados en el tracto de la hembra, la ZP es la última barrera que deben atravesar para fertilizar al óvulo. En la penetración de la ZP interviene probablemente un mecanismo mecánico y otro enzimático. En el primero las fuerzas generadas por el movimiento hiperactivo ayudan al paso del espermatozoide a través de la ZP. En el segundo, las enzimas liberadas durante la reacción acrosomal (RA) hacen una abertura en la ZP, a través de la cual el espermatozoides pueden penetrar (figura 14). (Galina, 2006)

La penetración de los espermatozoides en la zona pelúcida ocurre en los 5 a 15 min que siguen a la fijación. La reacción acrosomal puede ocurrir antes o después de la fijación de la cabeza espermática a los receptores glucoproteínicos en la zona, pero para la fijación es esencial que el gameto masculino tenga el acrosoma intacto. La unión de la cabeza del espermatozoide a ZP3 permite que ocurran interacciones con otros componentes de la zona, los cuales estimulan la activación del acrosoma. (Hafez, 2002)

Figura 14 Modelo de interacción entre los espermatozoides y la ZP.



Fuente: Acrosomal Exocytosis of Mouse Sperm Progresses in a Consistent Direction in Response to Zona Pellúcida (2009)

La acrosina liberada del espermatozoide durante la reacción acrosomal, tiene propiedades únicas. Ésta hidroliza las glicoproteínas de la ZP sin alterar el resto de la estructura de la misma, ni los sitios de unión del espermatozoide con la ZP. (Galina, 2006)

2.2.3.1 Reacción acrosómica (RA)

El proceso de liberación de los componentes del acrosoma históricamente se ha llamado «reacción acrosómica», para lo que el Ca^{2+} extracelular se considera esencial. (Buffone et al, 2009)

El acrosoma es una estructura vesicular que cubre el núcleo en la región apical de la cabeza del espermatozoide. Que aunque su forma y tamaño varían de especie a especie, su estructura básica es similar en los mamíferos euterios. La RA es un evento secretor que involucra una variedad de componentes incluidos en enzimas hidrolíticas, la primera reportada fue la hialuronidasa, después fueron identificadas la acrosina, proteinasa, esterasa, neuraminidasa, fosfatasa, colagenasa, β -galactosidasa, fosfolipasa C, entre otras. (González, 2002)

Tabla 3 Proteínas del espermatozoide y ligando potencial sugerido que juegan un papel en la interacción entre gametos.

	LIGANDO	ESPECIE
B- 1,4-Galactosiltransferasa	N-Acetil-glucosamina en ZP3	Ratón
Fucosiltransferasa	Desconocido	Ratón
Sp56	A-Galactosa	Ratón
Proteína 95 (p95)	Desconocido	Ratón
Proteína inmovilizador del Sulfoglicolipido	Glucolípidos sulfatados	Ratón
α -D-Manosidasa	Oligosacaridos de tipo rico en Manosa y del tipo hibrido	Ratón
Proteína de unión a manosa	α -Manosa	Hombre
Proteína de unión a fucosa	α -Fucosa	Cerdo
α -L-fucosidasa	Desconocido	Rata, Humano
Receptor de galactosa	N-Acetil-Galactosamina	Ratón, Rata
Fertilising antigens (FA-1-NZ-1)	Desconocido	Hombre
Sperm agglutination antigen-1	Desconocido	Hombre
PH-20	Desconocido	Cobayo
Zonadhesina (150 kDa protein)	Desconocido	Cerdo
Adhesion protein (APz)	Desconocido	Cerdo
Spermadhesina	Desconocido	Cerdo
Moléculas de tipo selectina	Desconocido	Hombre
Autoantígeno espermático de espermatozoide (RSA)	Desconocido	Conejo
SP17	Desconocido	Conejo
Proacrosina	ZP2 (grupo sulfato)	Ratón
Proteína de unión a ácido hialirónico	Manosa	Vaca
SED1(p47)	ZP2 y ZP3	Ratón y Cerdo

Fuente Estudio del reconocimiento y la unión entre gametos en la especie bovina (*Bos taurus*). Papel del ácido siálico en la interacción espermatozoide-zona pelúcida (2004)

La acrosina facilita la penetración de la ZP y su papel es importante para la dispersión de la matriz acrosomal durante la RA. Para la penetración, el espermatozoide crea una fisura en la ZP, la cual es aproximadamente igual a lo ancho y alto de su cabeza (Figura 14) Estudios demostraron que una de las tres glicoproteínas que constituyen la zona pelúcida del óvulo en ratones, la ZP3, sirvió como sitio de unión de los espermatozoides y como un inductor / estimulador de la exocitosis acrosomal. (Buffone et al, 2009)

El contenido acrosomal están envuelto por la membrana acrosomal externa (MAE), que está en aposición directa a la membrana plasmática (MP) y la membrana acrosomal interna (MAI), que está estrechamente asociada con la región anterior de la membrana nuclear. Aunque en los primeros estudios sobre el papel del acrosoma fue reportado como un lisosoma que podría liberar enzimas activas en la mediación de la penetración de los espermatozoides a través de la ZP, investigaciones recientes han demostrado que también hay partículas que componen el acrosoma llamadas matriz acrosomal que se compone de proteínas, como la proteína del espermatozoide del ratón sp56, que son capaces de mediar en la unión a los espermatozoides a la ZP. (Buffone et al, 2009)

Los inductores naturales de la reacción acrosómica, parecen ser sustancias presentes en el *cumulus oophorus* de la ZP. Algunas glicoproteínas de zona (ZP3) se unen a la membrana plasmática del espermatozoide sobre el capuchón acrosómico causando varios cambios que permiten un aumento temporal de la permeabilidad de la membrana y el Ca^{2+} extracelular. (González, 2002)

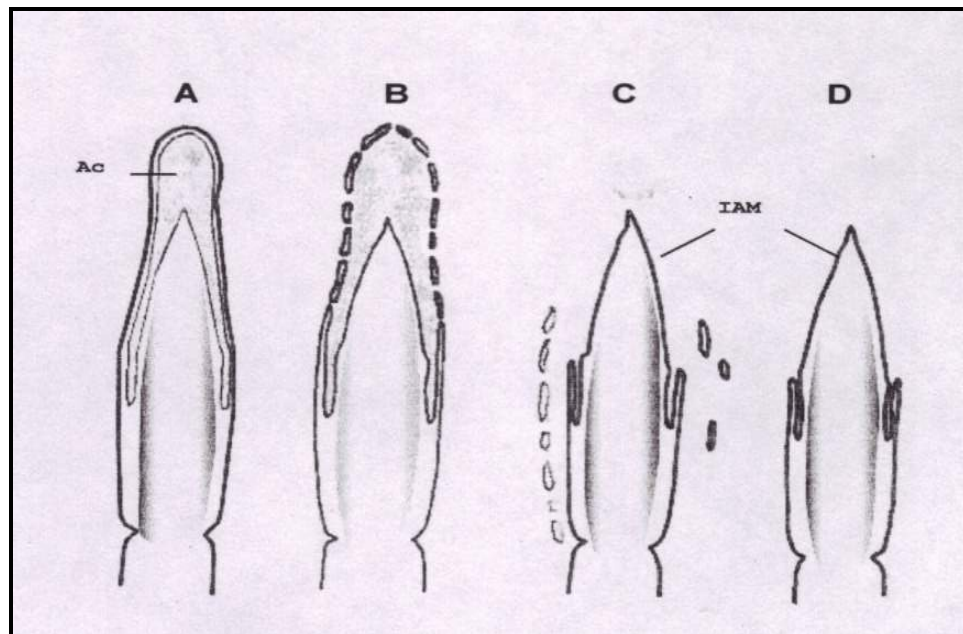
La zona pelúcida expone glicoproteínas de reconocimiento (Figura 15) que interactúan con la membrana del espermatozoide de varias formas: proteína-proteína, donde se reconoce el receptor de 95KDa del espermatozoide (receptor tirosina quinasa, TK); y proteína-carbohidrato para el reconocimiento de la Galtasa como receptor acoplado a proteína G, que se une a la N acetil glucosamina de la ZP3. Una vez que acoplan estas moléculas se activa la fosfolipasa C β 1 (PLC β 1) por una parte y, por la otra, posiblemente se activa la adenilil ciclasa, con el subsecuente aumento los niveles de AMP cíclico que activarían la proteína quinasa A (PKA), y permiten la apertura de un canal de Ca^{++} , voltaje dependiente, en la membrana acrosomal externa. Este pequeño incremento de Ca^{++} intracitoplasmático activa la fosfolipasa C γ que se une al receptor de tirosina quinasa para inducir una ruta de señalización vía fosfoinositol 2 fosfato (PIP2). (Olivera & Col, 2006)

La MP del espermatozoide se une a receptores y se inician dos procesos paralelos: a) un proceso que depende del Ca^{2+} que aumenta el pH intracelular mediante la entrada de iones Na^+ y la salida de H^+ . b) un proceso Ca^{2+} -dependiente que causa la despolarización de la membrana. Ambos procesos resultan en la abertura de canales que permiten el ingreso de los iones Ca^{2+} , que inducirá la fusión de las membranas plasmática y acrosómica, terminando con la exocitosis del contenido acrosómico. (González, 2002)

El receptor de TK y la proteína G, pueden activar un intercambiador de Na^+-H^+ en la membrana plasmática, lo que alcaliniza el pH citosólico. El incremento de Ca^{++} regula su propia salida tanto en la membrana plasmática como en la acrosomal, mediante la activación de canales de Ca^{++} , dependiente de ATP, y con la activación de los intercambiadores Na^+-Ca^{++} . La PKA fosforila los residuos de serina de las proteínas (PSP); éstas, a su vez, fosforilan los residuos de tirosina de las proteínas citosólicas que junto con el aumento del pH y de Ca^{++} citosólico, permiten la fusión de

membranas (citoplasmática y acrosomal externa) (Figura 16), y de esta manera se produce la exocitosis del contenido enzimático del acrosoma. El espermatozoide atraviesa la zona pelúcida (ZP) y alcanza el espacio perivitelino, los mecanismos involucrados en este paso aún se desconocen. (Olivera & Col, 2006)

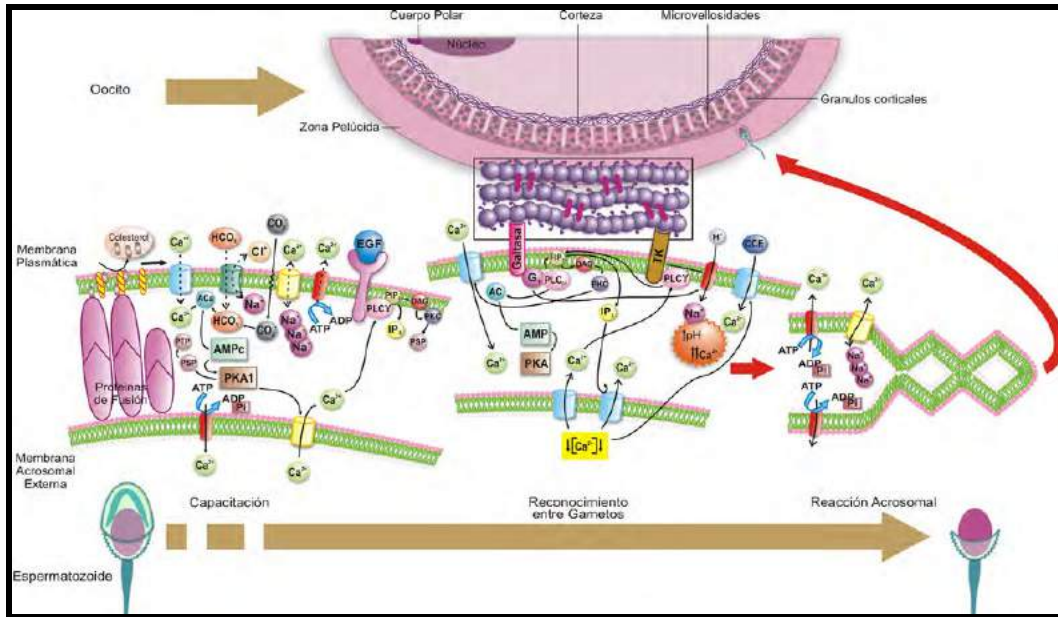
Figura 15 Esquema ilustrativo de las diferentes etapas producidas durante la reacción acrosómica del espermatozoide. **A:** Espermatozoide no reaccionado, **B:** Reacción acrosómica en proceso, **C-D:** Espermatozoide reaccionado, **Ac:** Acrosoma, **IAM:** Membrana acrosomal interna.



Fuente: Estudio del reconocimiento y la unión entre gametos en la especie bovina (*Bos taurus*). Papel del ácido siálico en la interacción espermatozoide-zona pelúcida (2004)

La reacción acrosomal es un proceso de exocitosis del espermatozoide y es absolutamente requerida para la fecundación. Sólo los espermatozoides con reacción acrosomal son capaces de atravesar la zona pelúcida (ZP), unirse a la membrana plasmática del óvulo y fusionarse con éste. La reacción acrosomal se inicia inmediatamente después de la unión primaria de la célula espermática con la zona pelúcida del óvulo. La ZP induce la reacción acrosomal a través de una de sus glicoproteínas (ZP3). Aunque la zona pelúcida es el principal inductor fisiológico de la reacción acrosomal, la progesterona, secretada por las células del cúmulo y presente en el fluido folicular es también un importante cofactor en este proceso de exocitosis. (Galina, 2006)

Figura 16. Modelo de eventos moleculares que se suceden durante la capacitación, el reconocimiento entre los gametos y la reacción acrosomal.



Fuente: El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización, (2006)

Mecanismos de inducción: son muchas las sustancias involucradas en la inducción de la reacción acrosomal que se presentan en el sitio de la fecundación. Entre ellas es posible mencionar:

- La glicoproteína ZP3 que es el inductor fisiológico de la RA *in vivo*.
- Se ha demostrado que la progesterona juega un importante papel en la inducción de la RA.
- En diversos trabajos se han presentado algunos de los cambios fisiológicos producidos en el espermatozoide que se requieren en la RA. Por ejemplo, en la capacitación espermática en ausencia de calcio, la RA no se realiza en forma adecuada. Si subsecuentemente se le adiciona calcio, la reacción se realiza en forma sincronizada. De igual forma, la lisofosfatidilcolina en espermatozoides de cobayo, toro y hombre es un efectivo inductor de la RA.
- Existen otras moléculas que inducen la RA, como las moléculas de ATP, inhibidores de fosfodiesterasas como la cafeína o la pentoxilina, factores de crecimiento, factores de activación plaquetaria, ácido gama-amino butírico, péptido natriurético auricular. (Velásquez, 2004)

2.2.4 Fusión de gametos

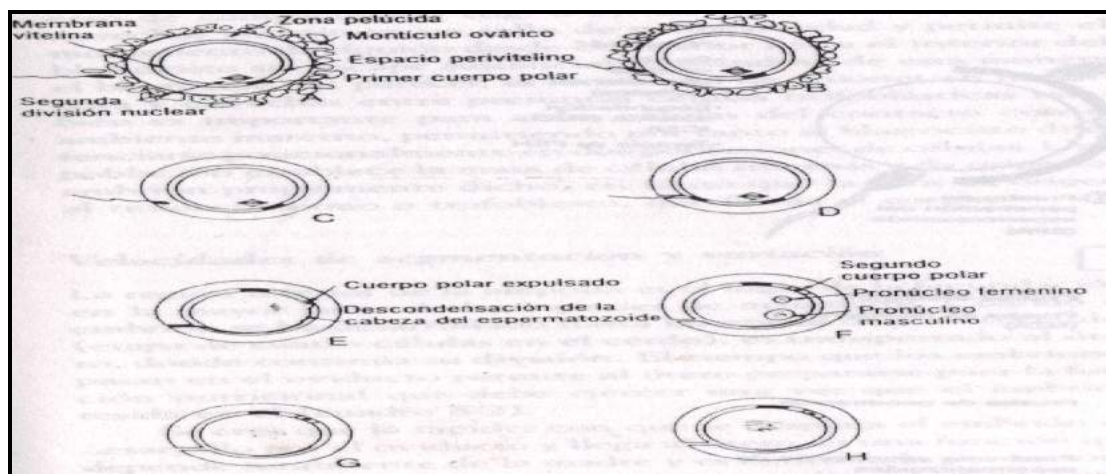
Es posible que la membrana vitelina tenga menos especificidad que la zona pelúcida para atraer espermatozoides heterólogos; sin embargo, es evidente cierto grado de selectividad, puesto que la membrana plasmática del óvulo se unirá completamente a más espermatozoides homólogos. La RA es un requisito previo para la fusión entre membranas plasmáticas de los gametos femenino y

masculino y los óvulos de la zona pelúcida libre no pueden experimentar fusión con espermatozoides que no han pasado por la activación acrosómica, aunque ocurra la fijación a la superficie de la membrana. La membrana vitelina podría tener menor especificidad que la de la ZP en adosar espermatozoides extraños, no obstante, algún grado de selectividad posee puesto que la membrana plasmática del huevo va a unirse en forma competitiva con mayor número de espermatozoides homólogos. Una vez que el espermatozoide atraviesa la ZP, su cabeza se mueve hacia el espacio vitelino y contacta con la membrana vitelina u oolema. Anteriormente se pensaba que muchos espermatozoides rodeaban al óvulo para dispersar el *cumulus* y así uno de ellos podía penetrar. En realidad esto no acontece, pues muy pocos espermatozoides se han encontrado alrededor del *cumulus* durante la fertilización. (González, 2002)

Los espermatozoides con capacidad de fertilizar se ligan a la superficie de la ZP antes de penetrar, mediante la interacción entre las moléculas de la zona y las de la superficie espermática (glicoproteínas, ZP2 y ZP3). Solamente los espermatozoides con el acrosoma intacto se ligan a la superficie de la zona, es decir, los receptores que están localizados en la membrana plasmática que rodea al acrosoma. Debiendo haber más de un tipo de receptor en la membrana espermática. (González, 2002)

El espermatozoide penetra el oolema de perfil y se dispersa el material celular dentro del citoplasma del ovocito. Actualmente se conocen que existen sitios de unión en la membrana plasmática del ovocito para el espermatozoide. Se han identificado las proteínas PH20 y PH30 en espermatozoides, que tendrían función de unión a zona y que tendrían funciones durante la penetración. (Figura 17). (Alonso & Caccia, 2007)

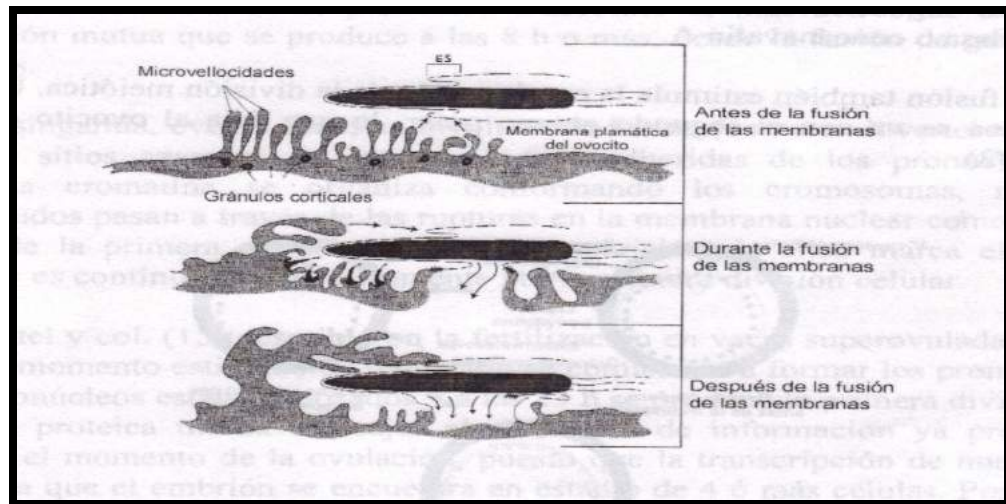
Figura 17 Pasos de la fecundación.



A. El espermatozoide entra por primera vez al montículo ovárico y penetra en él. El primer cuerpo polar está presente en el espacio perivitelino y el huso metafásico del Oocito secundario está en el citoplasma. B. Un espermatozoide ha experimentado reacción acrosómica. C. La membrana acrosómica externa del espermatozoide entra en contacto con la ZP. D. Las enzimas expuestas en la superficie de la membrana permiten la penetración hacia el espacio perivitelino. E. La región ecuatorial de la cabeza espermática se fija a la membrana vitelina y se fusiona con ella, estimulando la terminación de la segunda división meiótica. F. El gran pronúcleo femenino y masculino, de menor tamaño, se forma después de la liberación del segundo cuerpo polar. G. Los pronúcleos emigran al centro de los oocitos, donde las envolturas nucleares se dispersan. H. Se inicia la profase de la primera división mitótica.

La fusión espermatozoide ovocito es un evento importante en el proceso de la fecundación. Se presenta una vez que el espermatozoide con el acrosoma reaccionado ha atravesado le ZP, llega al espacio perivitalino y contacta con la membrana del ovocito, situándose de un modo paralelo a su superficie. La fusión ocurre a nivel de la región post acrosomal del espermatozoide (segmento ecuatorial) y una vez producida el gameto masculino deja de moverse y el espermatozoide es incorporado en su totalidad dentro del ovocito. La región posterior de la cabeza espermática y el flagelo se internalizan mediante fusión de membranas, mientras que la porción anterior de la cabeza se engloba por fagocitosis (Figura 18). (Velásquez, 2004)

Figura 18 Diagrama de la fusión de las membranas del espermatozoide y oolema.



Fuente: Physiology of Reproduction

La Fertilina y Cirtestina son proteínas que se expresan en los testículos y se localizan en la cabeza del espermatozoide. La fertilina es un heterodímero y la cirtestina (ADAM3) está compuesta por un solo polipéptido que parece que median el anclaje del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito. Con respecto a la presencia de las moléculas complementarias en la superficie del ovocito, la integrina 61 se ha identificado como el par para la fertilina y se postulo como el mediador de la unión espermatozoide-ovocito. (Velásquez, 2004)

El primer cambio visible que ocurre en el núcleo espermático, después de su incorporación en el citoplasma del huevo, es el rompimiento de la envoltura nuclear. Como resultado del rompimiento de la envoltura nuclear, la cromatina es expuesta al citoplasma del huevo. Eventualmente, la cromatina comienza a descondensarse hasta volverse una masa homogénea dispersa. Durante este proceso las protaminas son removidas de ácido desoxirribonucleico (DNA) y se reemplaza por histonas. Estos cambios son seguidos por el ensamblaje de una envoltura nuclear nueva alrededor de la cromatina descondensada para formar el pronúcleo masculino y se inicia la replicación de DNA. Después de la anafase II, los cromosomas del huevo permanecen dispersos en el cigoto, organizándose alrededor de éstos una envoltura nuclear nueva, formándose el pronúcleo femenino y la replicación del DNA. Cada pronúcleo contiene un número variable de nucléolos. (Galina, 2006)

La síntesis de DNA inicia casi sincrónicamente en ambos pronúcleos. Para asegurar el desarrollo sincrónico de los pronúcleos, el huevo posee una actividad supresora que previene el desarrollo del pronúcleo femenino durante las primeras horas de la activación del huevo. En turno, el desarrollo del pronúcleo masculino parece también estar sincronizado con la terminación de la meiosis y el desarrollo del pronúcleo femenino. Conforme crecen los pronúcleos se van acercando más uno al otro hasta que entran en contacto y se fusionan precisamente en el centro del huevo; más tarde la totalidad de la envoltura nuclear se rompe dejando escapar una masa de cromosomas parcialmente condensados. Los cromosomas completan su condensación y se acoplan, uniéndose así las contribuciones hereditarias paterna y materna. (Galina, 2006)

2.2.4.1 Poliespermia

La Poliespermia es una anomalía de la fecundación en la que se incorporan más de un espermatozoide en el ovocito. Las causas de la Poliespermia aún no están muy claras. Sin embargo, en teoría se han identificado algunas razones como una inadecuada cantidad del material de los gránulos corticales (GC), un retraso o descoordinación con la activación del ovocito y una inapropiada respuesta de la ZP. Este evento se puede presentar tanto *in vivo* como *in vitro*. (Velásquez, 2004)

In vivo, la fecundación polispérmica tiene más incidencia en unas especies que en otras. Esta fecundación polispérmica puede ser debida a un inadecuado manejo reproductivo y a la condición del ovocito. Existen situaciones naturales que en parte previenen esta anomalía, como la detección de los espermatozoides viables en la porción caudal del istmo antes de la ovulación y su posterior liberación en la ovulación. Las células del cumulus contribuyen a reducir el número de espermatozoides que llegan al ovocito. (Velásquez, 2004)

In vitro, la poliespermia es un problema importante durante el proceso de fecundación y es considerada en las diferentes especies entre 10 a 25% en rumiantes, 50% en porcinos y 5 a 10% en humanos. Estos niveles pueden ser debido al tipo de medio de cultivo, desarrollo y edad del ovocito, integridad de la ZP y/o concentración espermática, entre otros factores. (Velásquez, 2004)

2.2.4.2 Bloqueo de la poliespermia

La fertilización del espermatozoide provoca un cambio en función de la membrana del óvulo, de un estado que es receptivo a los espermatozoides a un estado poco receptivo para los espermatozoides (también conocido como el bloqueo de la poliespermia); sin embargo, la vía de señalización que conduce a este evento asociado con la transición de óvulo a embrión parece ser compleja. (Janice, 2009)

A diferencia de muchos de los cambios que se producen en el momento de la fecundación del óvulo, el bloqueo de la poliespermia no es provocado únicamente por el aumento del Ca^{2+} intracelular y probablemente también requiere señales asociadas con la entrada del espermatozoide. (Wortzman & Col., 2007, citado por: Janice, 2009)

Para evitar la poliespermia se suceden dos mecanismos, uno inmediato que es el cambio de potencial de membrana del oocito, que a su vez cambia la polaridad interna de la ZP; y otro subsiguiente que es la remodelación de la ZP, que ocurre por exocitosis del contenido enzimático de los gránulos corticales al espacio perivitelino; esta exocitosis está regulada por PKC dependiente de factores lipídicos e independiente de los iones de calcio. Se han identificado dos poblaciones de gránulos corticales que son liberados a tiempos y en lugares diferentes: el primer grupo, se libera durante la expulsión del primer cuerpo polar y el segundo muy cerca del sitio en donde comienza la citoquinesis de la primera división celular. El mecanismo propuesto para la remodelación de la zona pelúcida, es a partir de la alteración de los residuos de galactosa alfa y beta de la misma, particularmente las enzimas hidrolíticas y las glicoproteínas liberadas por los gránulos corticales. Los residuos de GlcNAc de la ZP3 que contiene la zona pelúcida (receptores de la Galtasa espermática) serían removidos por la N-acetilglucaminidasa, una de las enzimas que contienen los gránulos corticales, lo que no permitiría que más espermatozoides se adhirieran a la ZP3. (Olivera & Col, 2006)

En el bloqueo de la poliespermia se plantean principalmente dos mecanismos: bloqueo rápido y bloqueo lento o de zona.

Bloqueo rápido, como su propio nombre lo indica, se produce en un periodo corto de tiempo tras la fusión del primer espermatozoide con la membrana del ovocito. Se debe a una despolarización potencial del oolema en la fecundación (inmediatamente después de la penetración) produciendo un bloqueo de la polispermia a este nivel. (Velásquez, 2004)

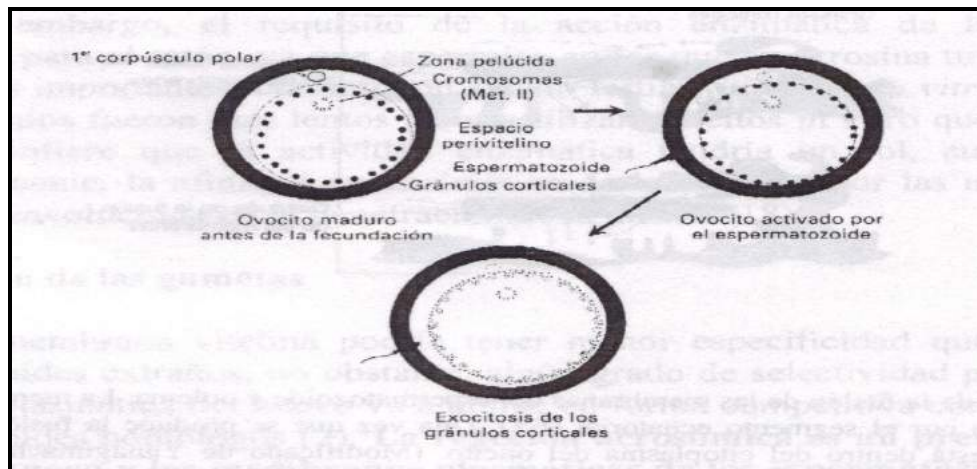
Bloqueo lento: en éste se evidencian dos eventos:

- **Exocitosis de los GC:** este es el primer evento, también llamado reacción cortical. Se inicia por las oscilaciones de calcio durante la penetración espermática. El calcio intracelular liberado induce la fusión de las membranas de los GC con el ooplasma y el contenido de los GC es liberado en espacio perivitelino. La fusión de los gránulos corticales también estimula la continuación de la división meiótica. Una mitad de la cromatina se va con el segundo cuerpo, lo que deja al ovocito en estado de haploidia (Figura 19). La exocitosis acrosomal abarca varios eventos distintos: la fusión de la MAE y MP (que conduce a la exposición del contenido acrosomal), la rápida pérdida acrosomal de los componentes solubles y la gradual pero más lenta dispersión de las proteínas de la matriz acrosomal. La exposición y la liberación retardada de las proteínas de la matriz acrosomal significa que estos componentes siguen asociados con la cabeza del espermatozoide y pueden participar en la unión con la zona pelúcida por un período más largo de tiempo. Su dispersión progresiva probablemente tiene lugar en un período de tiempo suficientemente largo para permitir que el espermatozoide entre y penetre la zona pelúcida en condiciones fisiológicas. Además, Kerr et al. (2002) marcaron con fluorescencia la ZP2 y ZP3 y utilizaron el análisis cuantitativo de imágenes para caracterizar la fijación saturable de ZP2 y ZP3 en sitios distintos del acrosoma intacto en la vida del espermatozoide de ratón. Encontraron cerca del 20% de los sitios de unión a ZP3 fueron localizados sobre la tapa acrosomal, mientras que el resto de los sitios estaban ubicados en la región postacrosomal

de la cabeza. En contraste, los sitios de unión ZP2 sólo se ha detectado en la región postacrosomal. (Buffone et al, 2009)

- **Reacción de zona:** el segundo evento es la modificación de la ZP por enzimas contenidas en los GC que han sido liberados por exocitosis. A este proceso se le conoce como reacción de zona. El exudado de los GC actúan en la ZP, causando cambios bioquímicos y estructurales que hacen que la capacidad de unión a los espermatozoides de ésta se vea disminuida.
Han sido descritas varias enzimas involucradas en la reacción de zona como son proteasas, una ovoperoxidasa y una hexosaminidasa. (Velásquez, 2004)

Figura 19. Exocitosis de los gránulos corticales, causantes de la reacción de zona y/o del bloqueo vitelino.



Fuente Fisiología Veterinaria (2003)

Mecanismos involucrados

Se evidencia una línea de investigación que implica tres situaciones principales como responsables del bloqueo de la poliespermia, situaciones que involucran a la proteólisis, la deglicosilación y la formación de puentes disulfuro después de la fecundación.

- **Proteólisis:** la función proteolítica del exudado de los gránulos corticales GC puede ser responsable de la baja actividad de unión espermática y bloqueo de la poliespermia. En las diferentes especies estudiadas incluido el ratón, la vaca, el cerdo y la especie humana, la proteólisis afecta la glicoproteína ZPA (ZP2). Algunos autores sugieren que esta proteólisis puede estar correlacionada con los cambios en la estructura tridimensional de la ZP y por lo tanto es el responsable del endurecimiento de la ZP observado tras la fecundación. Se postula que estos cambios en las capas externas de la ZP causan una desorientación del espermatozoide por los sitios de unión. (Buffone et al, 2009)

- **Deglicosilación:** Estudios previos han observado que no existen diferencias detectables mediante análisis bioquímico usando electroforesis en la glicoproteína ZP3 de ratón antes y tras la fecundación. Sin embargo, ZP3 obtenida de embriones de dos células ha perdido su actividad biológica es decir que ya no es capaz de unir espermatozoides ni de inducir reacción acrosómico. (Buffone et al, 2009)
- **Formación de puentes disulfuro:** Se ha observado que en la ZP, después de la fecundación o la activación *in vitro*, se produce un cambio en la sensibilidad frente a diferentes agentes. Se ha descrito un aumento de la resistencia a tratamiento con enzimas proteolíticas, al calor, a ácidos y al tratamiento con agentes reductores. Estas modificaciones o endurecimiento en la ZP estarían relacionadas con el bloqueo de la poliespermia y/o con la protección del embrión durante su paso por el oviducto. Recientemente se ha descrito en la especie bovina un incremento en el número de puentes disulfuro tras la fecundación. Autores sugieren que esta formación de nuevos puentes disulfuro junto con una proteólisis específica resulta en la construcción de una estructura de la ZP más rígida. (Buffone et al, 2009)

2.3 DESARROLLO DE PRONÚCLEOS Y SINGAMIA

Después de la fusión del espermatozoide con el óvulo, se inicia una serie de eventos bioquímicos y morfológicos que llevan a la formación del nuevo ser. Al penetrar el espermatozoide la membrana vitelina, el óvulo activado completa la meiosis y expulsa el primer y/o segundo cuerpo polar en el espacio perivitelino. Los cromosomas haploides maternos restantes son rodeados entonces por un pronúcleo. Los pronúcleos masculino y femenino emigran al centro del óvulo para nuevos arreglos en el armazón citoesquelético del óvulo después de la activación. (González, 2002)

La cromatina remanente, luego de la formación del segundo cuerpo polar, se vuelve difusa y presumiblemente sufre una modificación de las proteínas asociadas en la medida en que se transforma en el pronúcleo femenino rodeado de una capa nuclear. Cuando la cabeza del espermatozoide penetra al ooplasma, la cápsula nuclear se dispersa inmediatamente comienza la descondensación del material nuclear. A medida que el núcleo espermático se agranda, la protamina rica en cisteína y arginina asociada al ADN desaparece. (Alonso & Caccia, 2007)

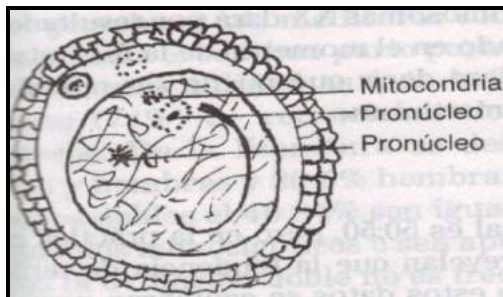
La singamia, evento final, no involucra la fusión sino la ruptura en sitios azarosos de las membranas adheridas de los pronúcleos. Luego, mientras la cromatina se organiza conformando los cromosomas, microtúbulos neosintetizados pasan a través de las rupturas en la membrana nuclear como precursores del huso de la primera división celular. La aparición de ellos marca el final de la singamia y es continuado inmediatamente por la primera división celular. (Alonso & Caccia, 2007)

La singamia es pues el estado final de la fecundación. Cuando la cabeza del espermatozoide se encuentra en el ooplasma se hincha y pierde su forma característica adquiriendo consistencia de gel. Dentro del núcleo espermático aparece un número de nucleolos que se juntan y una membrana nuclear se desarrolla alrededor de su periferia; la estructura final se asemeja más al núcleo de una célula somática que al de una espermátide y recibe el nombre de pronúcleo masculino. El crecimiento de ambos pronúcleos (femenino y masculino) se hace en forma sincrónica. La cromatina

masculina comienza su descondensación e hinchazón antes que la cromatina femenina, de aquí que el pronúcleo masculino sea más grande que el femenino (Figura 20 y 21). (González, 2002)

Durante el máximo desarrollo de ambos pronúcleos estos llegan a contactarse, luego a encogerse y finalmente a coalescer. El núcleo y la membrana nuclear desaparecen y los pronúcleos no se dejan ver. La vida de los pronúcleos es de 10 a 15 horas. Al tiempo que se aproxima la primera división, y dos grupos de cromosomas se tornan visibles, son los cromosomas maternos y paternos; se unen para formar un grupo único de cromosomas que representa *la primera mitosis de partición o profase de la primera mitosis de partición*. Desde este modo se ha completado la fertilización por medio del proceso de singamia (Figura 22). (Schroeder, 1999)

Figuras 20 y 21 Desarrollo de los pronúcleos masculino y femenino, Pronúcleos desarrollados (respectivamente)



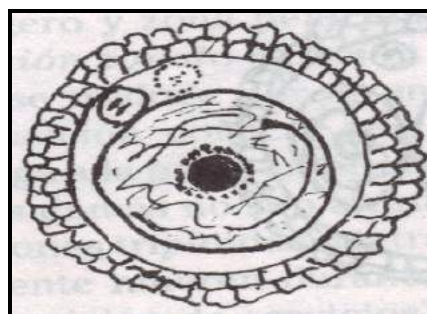
Desarrollo de los pronúcleos masculino y femenino. La mitocondria se reúne alrededor del pronúcleo masculino. Se inicia la singamia.



Pronúcleos desarrollados. El masculino es mayor que el femenino.

Fuente: Fisiopatología Reproductiva de la Vaca (1999)

Figura 22 Unión de los pronúcleos

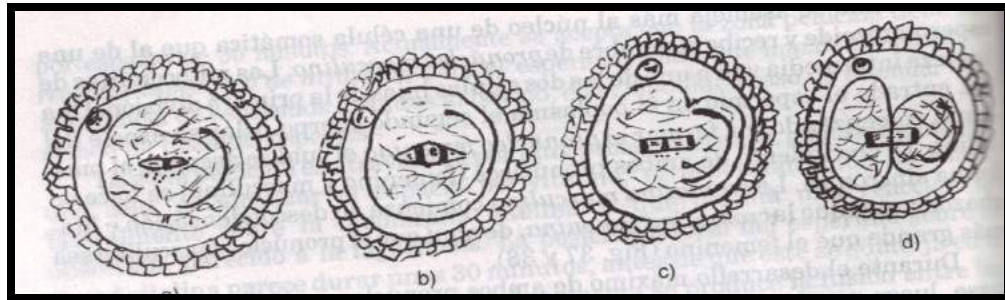


Unión de los pronúcleos. Finaliza la singamia y con esto la fertilización (fecundación)

Fuente: Fisiopatología Reproductiva de la Vaca (1999)

Durante la formación de los pronúcleos, que aparecen en la vaca entre 11 a 39 horas de la ovulación y que sobreviven alrededor de 10 a 15 horas se realiza la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) que representa el material genético tanto paternal como maternal. Luego sigue la disposición de los cromosomas en el estado de metafase y se hace visible la segmentación del huso; este proceso dura 12 a 30 horas (Figura 23). (Schroeder, 1999)

Figura 23. Inicio de la segmentación del huevo

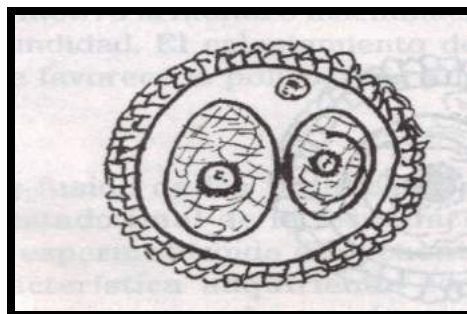


- a) Formación del uso acromático (anafase)
- b) Mitosis (anafase y telofase)
- c) Mitosis (anafase y telofase)
- d) División del ooplasma (vitelio)

Fuente: Fisiopatología Reproductiva de la Vaca (1999)

Una vez se ha llevado a cabo la fertilización y han aparecido las dos primeras células llamadas blastómeras (Figura 24), éstas continúan sufriendo mitosis, a razón de una división al día en la vaca. (Winters y col., 1952, citado por: Hernández et al., 2008)

Figura 24. Formación de 2 blastómeras



Embrión de dos células

Fuente: Fisiopatología Reproductiva de la Vaca (1999)

2.4 SEGMENTACIÓN

En los animales superiores, la unión del espermatozoide con el óvulo inicia una serie de reacciones químicas y físicas que partiendo de una sola célula conduce a través de sucesivas divisiones celulares a la formación de un individuo. Este individuo reacciona metabólicamente con la madre desde sus primeros estadios de desarrollo, comparte sus nutrientes y genera además, los mecanismos que le permiten nacer en el momento en el que su grado de desarrollo y madurez sea adecuado para sobrevivir. En el caso de los mamíferos, asegura previamente también, la producción de leche para alimentarse después del nacimiento. (Alonso & Caccia, 2007)

Después de la singamia, el cigoto lleva una existencia libre dentro del oviducto, y luego en el útero de la madre. Éste, con su nuevo potencial genético y su reciente arreglo del citoplasma, inicia la producción de un organismo multicelular. En todas la especies animales conocidas, esto inicia con un proceso llamado segmentación, una serie de divisiones mitóticas donde el volumen enorme del citoplasma del huevo es dividido. (Galina, 2006)

La pre-implantación se caracteriza por una serie de divisiones, el óvulo fecundado se subdivide en compartimientos más pequeños, se activa el genoma embrionario, se compacta, se cavita (formación del blastocisto) y finalmente se incuba y se ubica en la zona de implantación en la pared uterina. El principal logro de la pre-implantación es la formación de una estructura llena de fluido llamado blastocisto, compuesto de un epitelio exterior trofoectodermo (TE), que rodea un pequeño grupo de células llamado masa celular interna (MCI) y una gran cavidad llena de líquido. El TE, es el primer tipo de células diferenciadas del desarrollo, es un tejido especializado e inicia la implantación y es el formador de la placenta. La MCI son células pluripotenciales y conforman el embrión. (Duranthon & Col, 2008)

Después de la etapa de cigoto, los embriones experimentan varias divisiones mitóticas. El cigoto, o etapa de una célula, es bastante grande y tiene baja proporción núcleo/citoplasma. Para lograr una proporción similar a la de las células somáticas, experimenta divisiones celulares sin aumento en la masa celular. A este proceso se le denomina segmentación. El crecimiento durante este periodo puede considerarse negativo, puesto que la masa celular disminuye 20% en la vaca a 40% en la oveja; sin embargo, los núcleos sí aumentan de tamaño, y en los cromosomas se conserva la cantidad apropiada de ácido nucleico. (Hafez, 2002)

Al ser colocado en un nuevo entorno se refleja la capacidad de reprogramación del núcleo para modificar su patrón de expresión génica. La fertilización reúne el genoma haploide de dos células altamente diferenciadas, los gametos en el citoplasma del óvulo. Una de las primeras funciones del embrión fertilizado es reprogramar su genoma embrionario a un estado totipotente. (Duranthon & Col, 2008)

2.4.1 Adaptaciones uterinas, transporte y primeras divisiones del cigoto

Inmediatamente después de la singamia se inicia el desarrollo embrionario. El proceso que caracteriza esta primera etapa es la división celular. El cigoto se divide con una periodicidad de unas 24 horas mientras desciende por el oviducto; esto ocurre sin que se aumente la masa celular, total,

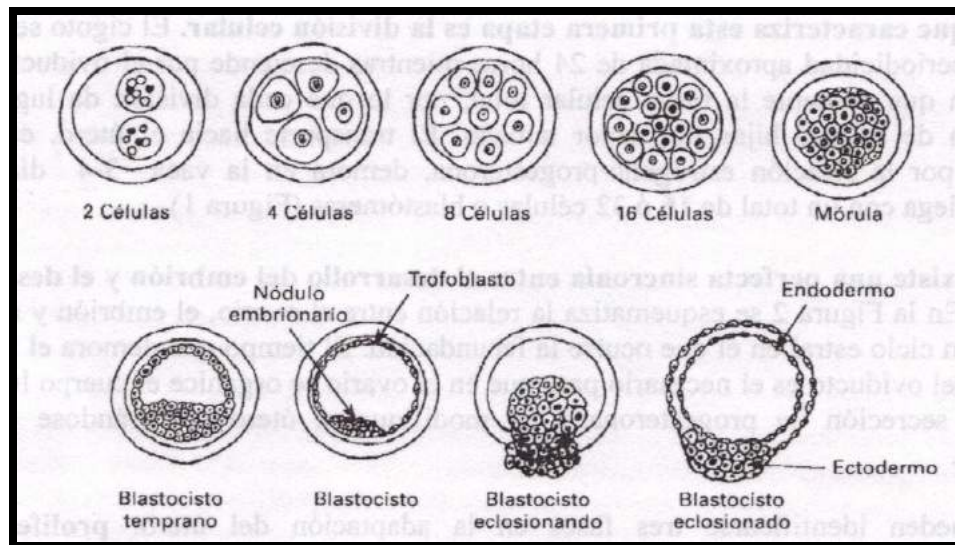
por lo que cada división da lugar a una formación de células hijas de menor tamaño. El transporte hacia el útero, en parte regulado por la relación estrógenos/progesterona, demora en la vaca 3-4 días y el embrión llega con un total de 16 o 32 células en blastómeras. (Alonso & Caccia, 2007)

El primer paso hacia la diferenciación es establecer la comunicación intercelular. La compactación se caracteriza por el aumento del contacto célula a célula y se forma el blastómero. La compactación se inicia en la fase de 8 células en el ratón, pero el tiempo varía según la especie. En todo caso resulta la formación de una mórula de 16 células (Figura 25). (Duranton & Col, 2008)

El desarrollo de la mórula hacia el estado de blastocisto necesita de la activación del genoma. La huella genética ("Gene imprinting") es un fenómeno por el cual los alelos paternos o maternos de un gen se expresan, mientras que el otro alelo se reprime, resultando en una expresión mono-alélica de los genes del genoma. (Swales y Spears, 2005 citado por: Hernández et al., 2008)

Los embriones en estado de mórula son relativamente independientes del ambiente uterino, pero en la mayoría de las especies se encuentran aún en el oviducto. Debe recordarse que las blastómeras están rodeadas por la zona pelúcida. La ZP tiene propiedades antiadherentes, lo cual facilitaría el desplazamiento del embrión a lo largo del oviducto y del útero. (Dey y col, 2004 citado por: Hernández et al., 2008)

Figura 25. Esquema de las etapas más representativas del desarrollo embrionario temprano.



Fuente Fisiología Veterinaria (2003)

Existe una perfecta sincronía entre el desarrollo del embrión y el desarrollo uterino. El tiempo que demora el tránsito a través del oviducto es el necesario para que en el ovario se organice el cuerpo lúteo, se inicie la secreción de progesterona y se modifique el útero preparándose para la gestación (Figura 26 y 27).

Figura 26. Primera etapa del ciclo estral día 0 al 7 posestro

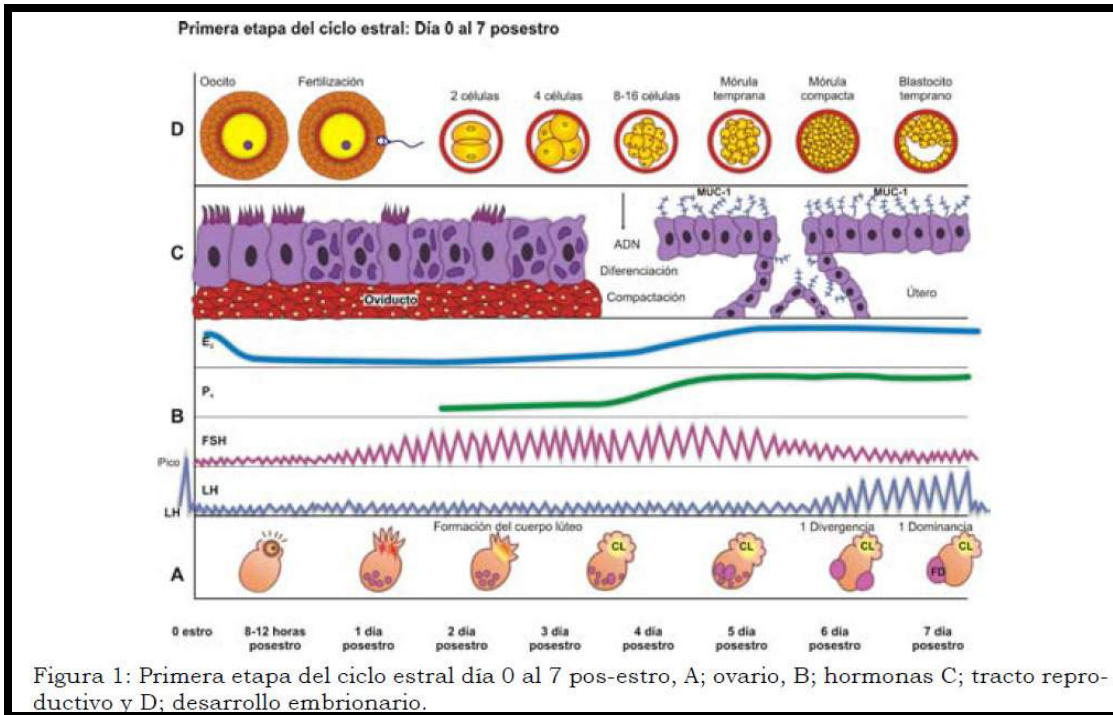
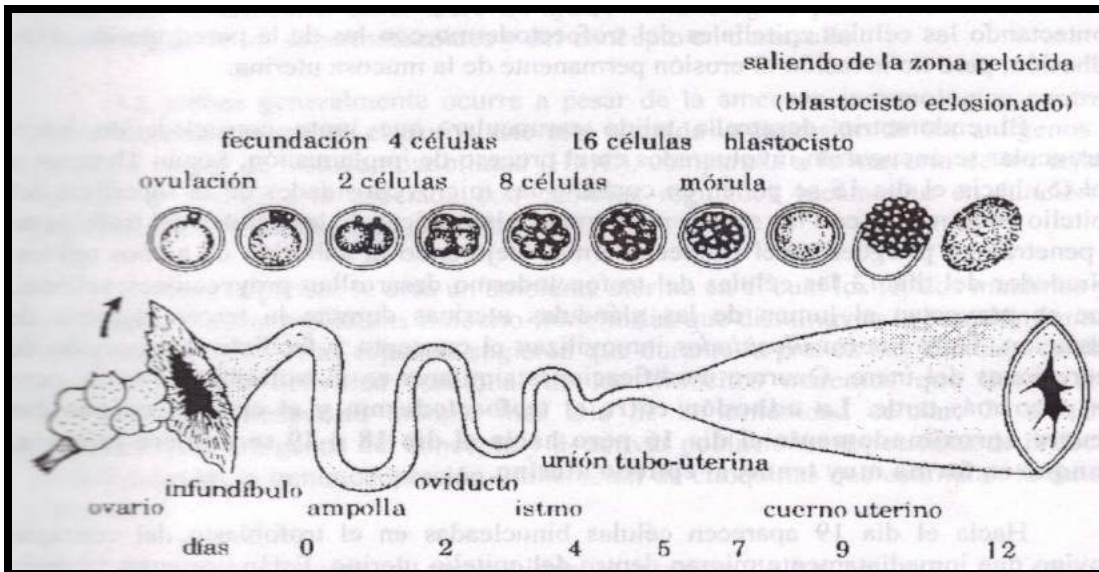


Figura 1: Primera etapa del ciclo estral día 0 al 7 pos-estro, A; ovario, B; hormonas C; tracto reproductivo y D; desarrollo embrionario.

Fuente López Cardona, Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión (2008)

Figura 27. Relación estado embrionario ubicación en el útero



Fuente Teoría y práctica de la fecundación in vitro (2005)

Pueden identificarse tres fases en la adaptación del útero: proliferación, crecimiento y distensión. Durante la fase de maduración folicular, la mucosa uterina bajo la influencia de los estrógenos, aumenta la vascularización y la proliferación celular (acción mitogénica). El epitelio es de tipo cilíndrico y contiene unas gotas de secreción celular en su superficie. En el estro (día 0) el epitelio del endometrio se encuentra en secreción máxima de tipo holocrino. Las glándulas son rectas por la edematización del estroma. Durante el metaestro (días 2 a 5 del ciclo), cuando se inicia la función del CL, el epitelio endometrial está ondulado y cubierto de moco. La secreción disminuye y se observan numerosas mitosis en las células. El incremento de los niveles de progesterona induce una deshidratación y disminución de la altura del epitelio por lo que el conducto de las glándulas uterinas se torna ondulado. En el diestro (días 6 a 18) o fase lútea, con una alta secreción de progesterona el epitelio superficial del endometrio tiene un curso recto y la mitosis termina. Las glándulas uterinas aumentan su luz y la secreción es muy activa en toda la superficie glandular. El conducto de las glándulas uterinas es intensamente tortuoso y la secreción es de tipo apócrino y merócrino. Las glándulas uterinas tienen un papel fundamental en la nutrición del embrión en sus primeros estadios de desarrollo, antes de la implantación. (Holy, 1983)

2.4.2 Blastocisto, expansión y eclosión

En el día seis o siete postovulación en bovinos, hay una diferenciación en el embrión, el cual está constituido por una masa de células indiferenciadas (estado de mórula). La diferenciación aludida resulta en el establecimiento, por un lado, de la masa celular interna y de una cavidad interna denominada blastocele. La masa celular interna queda rodeada por el trofoblasto, el cual demarca los límites externos del blastocisto, nombre que se le da ahora al nuevo ser. (Hernández et al., 2008)

En el útero las divisiones celulares continúan de manera sincrónica durante 1 a 2 días más. Luego, la masa celular, que tiene cierta polarización y células de diferentes tamaños, toma un aspecto muy compacto (mórula compacta) antes de comenzar a acumular líquido entre las células. La cavidad que forma es el blastocele y el embrión se ha transformado en blastocisto. (Alonso & Caccia, 2007)

Después de la tercera división, los blastómeros estrechan su relación y forman una masa celular compactada. Cuando llega el estadio de 16-32 células, se denomina mórula. Esta consiste en un grupo de células internas pequeñas rodeada por un grupo de células externas grandes. Pronto empieza a acumularse fluido en los espacios intercelulares y aparece luego una cavidad interna o blastocele. Cuando esta cavidad empieza a expandirse, el cigoto toma el nombre de *blastocito*. (Galina, 2006)

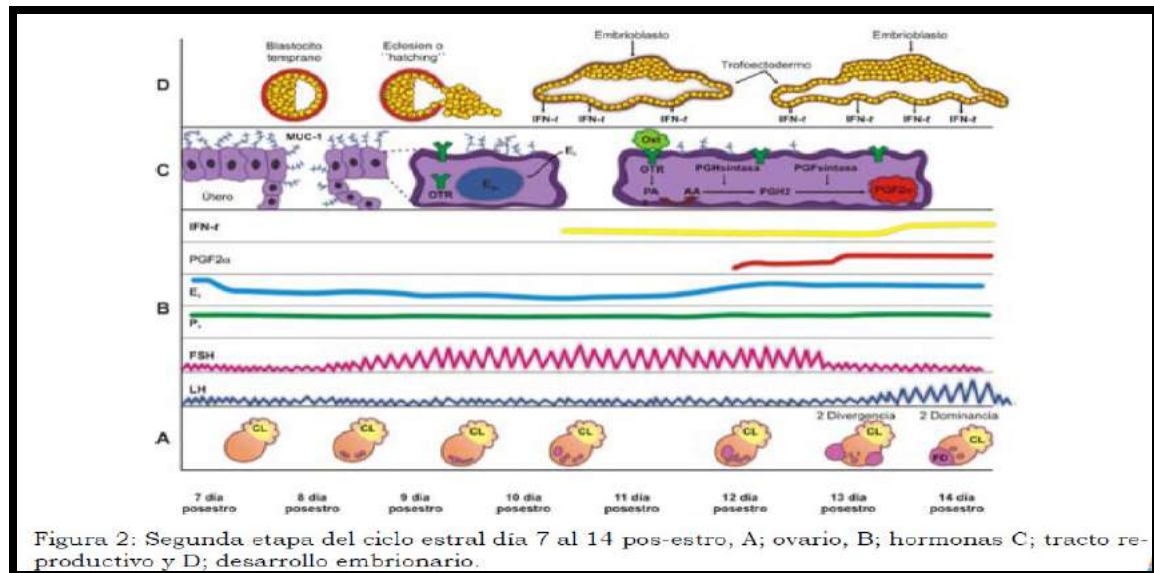
La formación del blastocisto cavitación o TE depende del transporte de iones y el agua, las funciones del TE median la dinámica de fluidos y controlan la formación del blastocisto. El modelo que se ha probado, es que la formación del blastocisto depende de la distribución polarizada de la Na/K ATPasa que se limita a los dominios de la membrana basolateral de TE. (Duranthon & Col, 2008)

La primera diferenciación celular (las células dejan de ser totipotenciales) se manifiesta en la polarización del embrión, una población de células pequeñas se ubica en un extremo constituyendo la *masa celular embrionaria o nódulo o disco embrionario* y otra de las células más grandes rodea el blastocele y se denomina *trofoblasto*. La primera dará origen al embrión, la segunda las membranas

extraembrionarias. El blastocisto amplia gradualmente su cavidad y crece presionando sobre la zona pelúcida que se hace más delgada hasta que en el día 9, este *blastocisto expandido* se libera de la zona pelúcida o eclosiona saliendo por el punto de rotura. Entre las causas de la rotura de la zona pelúcida se mencionan el crecimiento y expansión del blastocisto, el aumento en el líquido en el blastocele y las contracciones rítmicas del embrión, que se producen como consecuencia de las anteriores; se han sugerido además factores uterinos, enzimáticos o sensibilización por estrógenos. (Alonso & Caccia, 2007)

El proceso de diferenciación continúa con la formación de las hojas embrionarias, ectodermo, mesodermo y endodermo a partir de la masa celular embrionaria. Se definen así tipos celulares, cada uno de los cuales dará origen a algunos tejidos y no a otros. Una vez eclosionado el blastocisto, que hasta este momento es esférico y mide solo 160-180µ, el embrión se alarga y crece rápidamente adquiriendo una forma oblonga o tubular de 1,5 a 3 mm de diámetro en el día 12 a 13. En los días 13 a 14 adquiere forma oblonga a filamentosa y mide 1,4x10mm y en el día 18 mide 1,4x160mm. Hacia el día 17-18, el concepto bovino ocupa aproximadamente dos tercios del cuerpo uterino grávido y todo el cuerno hacia el día 20; en los días 20 a 24 se extiende también hacia el cuerno uterino contralateral (Figura 28). (Alonso & Caccia, 2007)

Figura 28. Segunda etapa del ciclo estral día 7 al 14 posestro



Fuente López Cardona, Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión (2008)

Considerando que los ácidos grasos insaturados tienen importantes funciones en el desarrollo fetal a través del mantenimiento de la fluidez, permeabilidad, y la conformación de las membranas, así como al actuar como precursores de prostaciclina, prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, sus funciones específicas en el desarrollo embrionario temprano, en particular en el ganado, no están bien definidos. (Herrera, 2002 & Haggarty, 2002, citado por: Thangavelu et al., 2007)

3. IMPLANTACIÓN

La implantación no es más que el proceso de fijación del embrión mamífero a la pared uterina de su progenitora. La placentación es el mecanismo por medio del cual el embrión es capaz de nutrirse de las reservas de su madre. Dentro de la fisiología de la reproducción en los mamíferos, la implantación y la placentación constituyen fenómenos indispensables para el desarrollo y la nutrición del embrión, además, de que hay una íntima relación entre la tasa de fertilidad y mortalidad embrionaria con estos dos fenómenos. (Galina, 2006)

La implantación suele ocurrir durante la fase de elongación del blastocisto, aproximadamente entre los días 11 y 13. Al igual que en la mayoría de las especies de interés zootécnico, en el bovino no hay una verdadera implantación. La *vesícula blastodérmica* (conceptus), rodeada en este momento por el trofoectodermo (trofoblasto+ectodermo+mesodermo diferenciados) toma una posición central en la luz uterina contactando las células epiteliales del trofoectodermo con las de la pared uterina. Hay adhesión, pero no invasión ni erosión permanente de la mucosa uterina. (Alonso & Caccia, 2007)

La implantación es un proceso de desarrollo complejo, que implica un diálogo recíproco entre el blastocisto y el útero y es esencial para el desarrollo embrionario en el útero y lograr la preñez. El útero se diferencia para facilitar la implantación primaria del blastocisto, esta diferenciación es mediada por la progesterona (P4) y los estrógenos. Estas hormonas esteroideas median su acción por medio de la unión a receptores nucleares. Las células heterogéneas del útero responden únicamente a la acción de la P4 y los estrógenos. En ratones adultos, los estrógenos estimulan la proliferación de los epitelios luminal y glandular, mientras que el estroma requiere de P4 y estrógenos. La misma regulación hormonal se produce en el útero durante el periodo de pre-implantación (días 1-4). En los días 1 y 2 (día 1 = tapón vaginal), la acción pre-ovulatoria de los estrógenos en el ovario, estimula la proliferación de las células epiteliales en el útero. El día 3, la P4 producida por el cuerpo lúteo recién formado, inicia la proliferación de las células del estroma. Lo cual se ve estimulado por la secreción de estrógenos en la mañana del día 4 pre-implantación. (Sanjoy, 2009)

Numerosas moléculas, incluyendo las hormonas esteroides, las prostaglandinas, hormonas peptídicas, citoquinas, factores de crecimiento, y así sucesivamente, participan en este proceso. Un número de moléculas han sido reconocidas en las células del trofoblasto y el endometrio, como el interferón-tau (IFN-t), las glicoproteínas asociadas a la preñez (GAP), lactógeno placentario (LP), proteínas de la leche uterina, la ciclooxygenasa y matriz-metaloproteinasas (MMP). (Hashizume, 2007)

3.1 DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO

3.1.1 Formación del blastocisto

Los aspectos generales del desarrollo embrión desde la fecundación hasta el momento en que el blastocisto sale de la zona pelúcida son relativamente similares en todos los mamíferos. Aunque existen diferencias en las fechas de estos eventos y donde se dan en el tracto reproductivo de la madre, de formación de blastocistos generalmente se inicia cuando el embrión entra en el útero. (Roberts et al, 2008)

El desarrollo de las uniones intercelulares estrechas de la mórula durante la compactación va seguido por la acumulación de líquido dentro de la cavidad central formando el blastocele. La acumulación de líquido dentro del blastocele proviene del movimiento de agua, que resulta del metabolismo mitocondrial, seguido de la localización de bombas de Na^+/K^+ activas en la membrana basal del trofooctodermo. La expansión del blastocele coloca las células de la mórula compactada en la parte de adentro o en la de afuera de la vesícula llena de líquido. Este posicionamiento lleva a la formación del trofoblasto (capa celular externa) y a la masa celular interna (embrioblasto) que se fija en un polo abajo del trofoblasto. La diferenciación de dos poblaciones celulares distintas ocurre después de la formación del blastocisto. La mayor parte de las células forman la capa cuboide periférica externa, denominada *trofoblasto* o *trofoectodermo*, que está cubierta por densas microvellosidades y participa en la captación selectiva de nutrimentos. En una fase posterior del desarrollo, el trofoblasto dará origen al corion. Un segundo grupo de células que residen en un polo bajo el trofoblasto forman el embrioblasto (masa de células internas), el cual se convierte en las tres capas germinales principales del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo) durante el proceso de granulación. El desarrollo adecuado del conceptus en la gestación temprana es fundamental para la implantación y el mantenimiento de la preñez a término. La pérdida gestacional puede ser alta durante el proceso de elongación inicial del blastocisto, lo que indica que es un período crucial para el desarrollo. A diferencia del blastocisto de humanos y de ratón, el blastocito de ungulados sigue siendo independiente en el útero y las transiciones, a través de una fase de desarrollo rápido el trofoblasto cambia drásticamente la morfología del blastocisto antes de su implantación. La elongación, es decir el alargamiento y la transición morfológica del conceptus y del los tejidos extraembrionarios en forma de esfera u ovoide pasa a forma filamentosa, esto se produce en todos los ungulados durante la pre-implantación y es concomitante con la gastrulación. La expansión del trofoblasto proporciona una mayor área de superficie placentar para permitir el contacto con la madre: permite al embrión el intercambio de nutrientes que son esenciales para la supervivencia del feto. (Blomberg, 2008)

3.1.2 Liberación del blastocisto

La liberación (eclosión) del blastocisto de la zona pelúcida ocurre en el útero 4 a 8 días después de la ovulación. La exposición al ambiente del útero estimulado por estrógenos puede causar reblandecimiento de la zona pelúcida y permitir que el blastocisto se expanda y rompa dicha capa. Al parecer en la vaca, la expansión y contracción del blastocisto constituyen el principal factor en la liberación de éste por desgarro de la zona, aunque es posible que también participen las enzimas implicadas en el debilitamiento de esta última. La zona pelúcida se rompe en el plano ecuatorial,

permitiendo al blastocisto abrirse paso entre los dos bordes de la abertura. Las prostaglandinas (especialmente de la serie E) intervienen en el proceso de liberación del blastocisto, puesto que sus antagonistas impiden tanto la expansión como la liberación del blastocisto. Por tanto, la expansión del blastocisto aparentemente es un proceso vital para la liberación y la producción de factores enzimáticos por el útero y el propio blastocisto tiene una función de apoyo. En el día 11 posterior al estro en la oveja y en el 13 en la vaca, el blastocisto entra en una fase de alargamiento logarítmico. De ser una esfera hacia el día 13, el blastocisto de la vaca se ha transformado en un filamento de 25 cm el día 17. Para el día 18 de la gestación, el blastocisto se ha extendido hasta el oviducto contralateral. En la oveja y vaca este rápido alargamiento lateral del producto ocurre por hiperplasia continua del trofoectodermo y endodermo extraembrionario. (Hafez, 2002)

3.1.3 Migración intrauterina

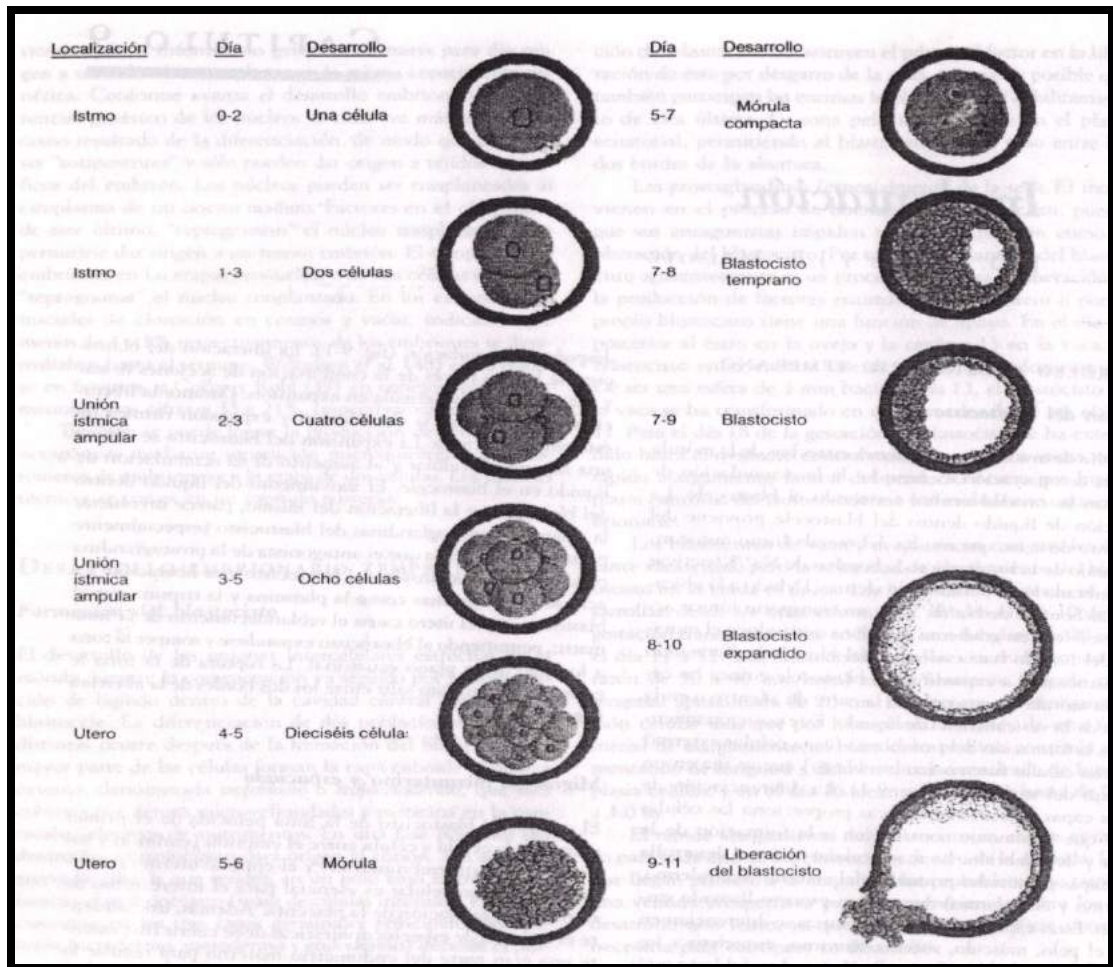
Para que el embrión temprano en mamíferos pueda sobrevivir, tiene que intervenir en la fisiología materna para bloquear la ciclicidad ovárica y garantizar que se mantenga la producción de progesterona del cuerpo lúteo (CL). El embrión necesita también explotar el espacio ofrecido a través del endometrio uterino, intensificar su capacidad de acceso a los recursos derivados del metabolismo materno y sobrevivir a la posible destrucción en un entorno potencialmente hostil. (Roberts et al, 2008)

La madre, a su vez debe evitar la explotación excesiva y tener cierto grado de control sobre las demandas de nutrientes del embrión. También debe ser capaz de evaluar la aptitud de su futura progenie, lo antes posible durante su embarazo, de modo que pueda tomar decisiones acerca de si el embarazo debe continuar. No es de extrañar que la comunicación bidireccional entre el embrión y la madre se establezca relativamente pronto en el desarrollo del embrión, y que la pérdida del embarazo se presente antes de que termine la implantación. (Roberts et al, 2008)

El escape del blastocisto de la zona pelúcida da el primer contacto de célula a célula entre el embrión (embrión y sus membranas extraembrionarias) y el epitelio uterino materno. El contacto celular es esencial para el intercambio de nutrientes y la fijación de la placenta. Además, inicialmente el embrión de especies domesticas debe cubrir físicamente una gran parte del endometrio materno para regular la liberación de prostaglandinas $F_{2\alpha}$ y prevenir con ello la luteólisis (Figura 36). (Hernández et al., 2008)

En la vaca, la migración embrionaria del cuerno ipsilateral al contralateral es poco frecuente. Sin embargo, el embrión debe desplazarse dentro del cuerno ipsilateral para ocupar un sitio de implantación, en la mitad posterior del mismo. Se ha reportado que existe una mayor densidad capilar en las zonas preferenciales de ubicación del embrión en úteros de vacas cíclicas. (Umaña y Hernández, 1994 citado por: Hernández et al., 2008)

Figura 29. Etapas del desarrollo temprano en el embrión bovino.



Fuente: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales (2002)

3.1.4 Expansión embrionaria

Poco después de la liberación del blastocisto, éste entra en una fase de crecimiento y desarrollo rápido. Durante esta fase, una capa interna de células endodérmicas extraembrionarias originadas a partir del embrioblasto encierra al blastocele, formando así un blastocisto bilaminar. Las células del endodermo extraembrionario se desarrollan en una membrana continua que se volverá un componente del saco vitelino. El embrioblasto (masa celular interna) es viable fuera del blastocisto cuando la capa de trofoectodermo que lo cubre (llamada célula de Rauber) se ha degenerado exponiendo al embrioblasto al ambiente materno. En el día 14 o 15 en la vaca el embrión experimenta un crecimiento logarítmico y una fase de elongación. El embrión bovino se transforma de una figura esférica de 3 mm, aproximadamente hacia el día 13 a una forma filamentosa de 25 cm el día 17. Para el día 18 de la gestación, el blastocisto se ha extendido hasta el oviducto contralateral. En la pre-implantación el trofoblasto crece vigorosamente en tamaño y en particular en

longitud durante este tiempo sin dejar de ser libre dentro de la cavidad uterina, como un parásito en el intestino. (Roberts et al, 2008)

3.2 ETAPAS PREIMPLANTATORIAS Y RECONOCIMIENTO DE LA PREÑEZ

Inicial mente el trofoblasto ésta constituido por un epitelio simple cúbico, el cual se desarrolla posteriormente para convertirse en un tejido que es en general, epitelial cúbico biseriado. Dentro de las características importantes de este epitelio desarrollado, figuran en especial, la presencia de células gigantes binucleadas. Las células binucleadas aparecen al comienzo del proceso de implantación y secretan múltiples moléculas, dentro de la cuales se encuentra la proteína I relacionada con la prolactina y el lactógeno placentario (también llamada somatomamotrofina) las cuales parecen participar en el proceso de implantación. (Yamada & col, 2002 citado por: Hernández et al., 2008)

Sin embargo, el desarrollo del trofoblasto no sucede de manera similar en las diferentes zonas del conceptus. Mientras que en las áreas más cercanas al embrión el trofoblasto existente es predominantemente desarrollado, en las más alejadas de éste, mantiene su estructura simple cúbica. (Gaviria y Hernández, 1994 citado por: Hernández et al., 2008)

Lo anterior sucede en la oveja, entre los días 14 y 24. En la vaca, entre los días 18 y 35. Después de esta época, el trofoblasto se ha desarrollado en la mayoría del área del conceptus. Hacia el día 22 de la gestación en la oveja y el 28 en la vaca, se observa la aparición de una necrobiosis en el trofoblasto de las extremidades del conceptus. Este proceso progresa hacia la zona de ubicación del embrión, hasta ocupar cerca del 70% de la extensión total del conceptus, aproximadamente a los 30 días en la oveja y en estadios de desarrollo; en la vaca, a los 45 días aproximadamente, para luego disminuir en el avance de la gestación. (Jiménez y Hernández, 1982 citado por: Hernández et al., 2008)

3.3 IMPLANTACIÓN

La implantación embrionaria es un proceso complejo, que comprende una serie de etapas que comienzan con la fijación del blastocisto al útero y termina con la formación de la placenta definitiva. Para que la implantación tenga éxito, se requiere de una comunicación entre el embrión y el endometrio a través de una serie de señales moleculares y celulares que conllevan finalmente a una sincronía entre el desarrollo del embrión y una compleja serie de eventos inducidos en el útero por los estrógenos y la progesterona. (Peña & col, 2007)

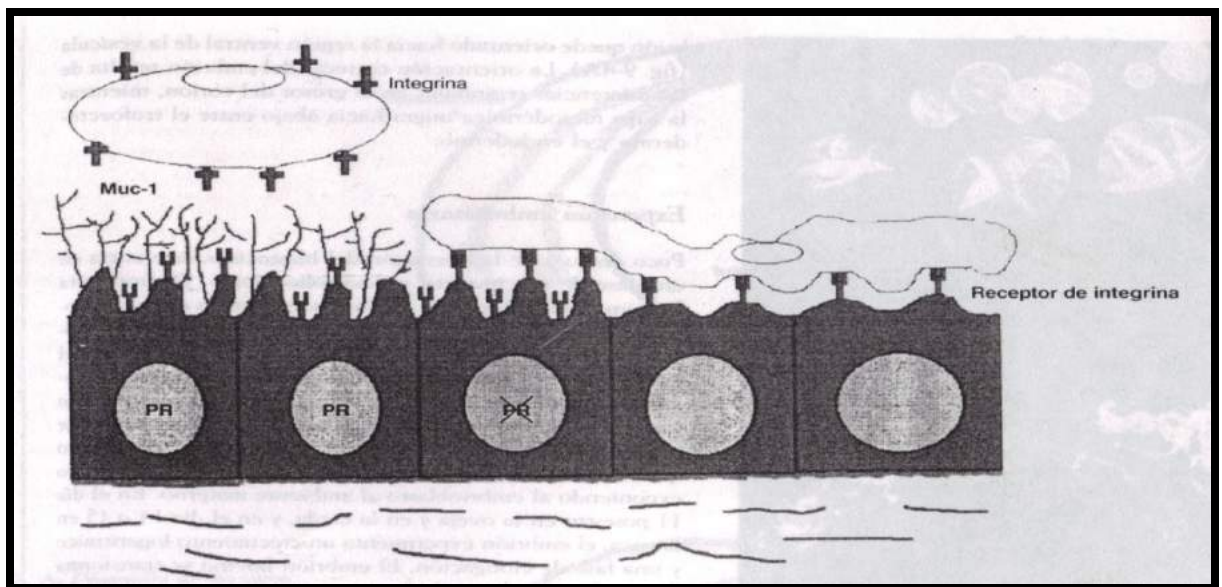
La implantación del embrión implica una serie compleja de interacciones secuenciales entre el embrión y el útero, empezando con el acoplamiento del blastocisto al epitelio luminal del endometrio y termina con la formación definitiva de la placenta. Las interacciones embrión-endometrio solo pueden iniciarse cuando el embrión y el endometrio han alcanzado un estado de madurez preciso, el embrión debe estar en la fase de blastocisto y en el endometrio y para que sea receptivo deben haber ocurrido cambios que dependen principalmente de hormonas. (Kennedy et al, 2007)

El proceso de implantación del blastocisto en los mamíferos es muy variable, sobre todo en el grado de invasión del trofoblasto al endometrio. En algunas especies hay poca o ninguna invasión de células trofoblásticas en el endometrio, mientras que en otros la invasión es extensa. En aquellas especies con limitada, o poca invasión, el endometrio sufre pocos cambios en respuesta a la implantación. (Kennedy et al, 2007)

Para que la implantación se efectúe con éxito, debe darse una serie de condiciones que pueden resumirse así: 1) ausencia de rechazo inmunológico, 2) bienestar materno (incluido un ambiente uterino favorable) y 3) constitución genética ventajosa del embrión. (Hernández et al., 2008)

La superficie apical del epitelio uterino inicialmente está cubierta por un grueso glucocaliz que se desvanece conforme se acerca el momento de la implantación del embrión. Una glucoproteína transmembranosa, llamada Muc-1, es abundante durante la fase no receptiva de la preñez y puede servir como factor antiadherente. La presencia de Muc-1 se reduce notablemente o está ausente, durante el periodo de fijación del embrión a la superficie uterina. El momento de la implantación, o en el caso de la fijación placentaria en las especies domesticas, se puede regular por el tiempo que el endometrio está expuesto a la estimulación de la progesterona. Las concentraciones de progesterona en suero se aumentan rápidamente después de la formación del cuerpo lúteo. Después de 8 a 10 días de exposición a la progesterona, se presenta una disminución de receptores nucleares para dicha hormona en el epitelio uterino, que conduce a la pérdida del efecto directo de la progesterona en este tipo de célula. Como la síntesis epitelial de Muc-1 es estimulada por la progesterona, la pérdida del receptor de progesterona del epitelio uterino reduciría la producción de Muc-1 y se abriría un estado receptivo para la adhesión del embrión (Figura 37). (Hafez, 2002)

Figura 30. La implantación del embrión en especies domesticas no es invasiva.



Fuente Reproducción e Inseminación Artificial en Animales (2002)

La implantación del embrión en especies rumiantes incluye aéreas carunculares e intercarunculares del endometrio uterino. Primero ocurre una fijación transitoria mientras el embrión bovino y ovino desarrolla vellosidades en forma de dedos (papilas) que se proyectan en el interior de la luz de las glándulas uterinas. Estas papilas proporcionan un ancla temporal y una estructura absorbente para el embrión mientras progresa una implantación más completa. La pérdida o la reducción de la altura de las microvellosidades de la superficie trofoblástica permite un contacto cercano de la superficie con las microvellosidades del epitelio uterino. Este último se comprime hacia la superficie trofoblástica interbloquéandose con las proyecciones citoplásmicas en la superficie del trofoblasto hasta que las microvellosidades del trofoblasto vuelven a desarrollarse, formando una adhesión más compleja. (Spencer et al, 2007)

El endometrio desarrolla tejido caruncular, que junto con el tejido intercaruncular se encuentran involucrados en el proceso de implantación. Hacia el día 15 se ponen en contacto las microvellosidades de la superficie del epitelio endometrial con las suaves membranas plasmáticas de las células del trofoblasto y penetran en pliegues en el trofoectodermo, mejorando la adhesión de ambos tejidos. Alrededor del día 13 las células del trofoectodermo desarrollan proyecciones vellosas, que se proyectan al lumen de las glándulas uterinas durante la tercera semana de gestación. Estas microvellosidades inmovilizan el conceptus y facilitan la absorción de secreciones del útero. Ocurren modificaciones similares en el trofoblasto bovino, pero un poco más tarde. La adhesión entre el trofoectodermo y el epitelio caruncular ocurre aproximadamente el día 16 pero hacia el día 18 o 19 se adhiere también, aunque en forma muy tenue, al epitelio uterino. (Thatcher & Bieneli, 1996)

Hacia el día 19 aparecen células binucleadas en el trofoblasto del conceptus bovino que inmediatamente migran dentro del epitelio uterino. Están presentes también células gigantes multinucleadas que forman un sincitio en la medida que se van estrechando en una capa de tejido. La migración de las células binucleadas se produce durante toda la gestación. La formación de células binucleadas, la presencia de células gigantes y la migración de células binucleadas están asociadas con la degeneración de la superficie del epitelio endometrial. Esto es seguido por la remoción de tejido por fagocitosis y restauración del epitelio superficial del endometrio. (Alonso & Caccia, 2007)

Las funciones de las células binucleadas incluyen:

- Remoción y reemplazo del epitelio endometrial superficial.
- Establecimiento de un sincitio entre los compartimientos materno y conceptual para promover la protección inmunológica al concepto.
- Producción de gonadotrofina coriónica.
- Producción y transporte de macromoléculas.
- Inmovilización del trofoectodermo para acomodar la interdigitación de microvellosidades con el epitelio endometrial. (Alonso & Caccia, 2007)

Los estados tempranos de preimplantación embrionaria *in vivo*, pueden ser regulados por los factores de crecimiento tanto de origen materno como embrionario. Algunos como la insulina y el IGF-I se han encontrado en el oviducto bovino durante el descenso del embrión al útero. Se han

encontrado productos de expresión de genes que codifican factores de crecimiento, en embriones de bovino en estado preimplantatorio. Dentro de ellos están los ARNm de TGF- α , TGF- β 1, PDGF- α , IGF-I, IGF-II, TGF- β 2, TGF- β 3, IL-3 e IL-6, además citoquinas como el factor inhibidor de la leucemia (LIF). Igualmente los genes que codifican los receptores para IGF, PDGF- α y el factor estimulante de colinas (CSF-I). (Peña & col, 2007)

En el embrión bovino la transcripción para TGF- α y PDGF- α es detectable en todos los estados, desde una célula hasta blastocisto como en el ratón; igualmente la transcripción para TGF- α e IGF-II y receptores para PGDF- α , insulina, IGF-I e IGF-II también fueron detectados en este mismo periodo. En el bovino el producto del genoma materno (FGF, bTP-1) solo fue detectado a partir del estado de 8 células Y los transcritos para EGF y NGF no fueron detectados en ningún estado. (Peña & col, 2007)

3.4 RECONOCIMIENTO DE LA PREÑEZ

La gestación se establece y mantiene en respuesta a la interacción entre el conceptus (embrión y membranas asociadas) y el endometrio lograda mediante el proceso denominado reconocimiento materno de la preñez (RMP), definido como el periodo crítico en el cual el conceptus da señales de su presencia a la madre para lograr el mantenimiento y la integridad funcional del CI. El CL produce la hormona de la preñez (progesterona), la cual es responsable de mantener las funciones endometriales que permiten el desarrollo embrionario temprano, la implantación, placentación y el desarrollo del feto y placenta. (Spencer y col., 1996 citado por: Hernández et al., 2008)

El reconocimiento materno del embarazo es el proceso fisiológico por el cual el embrión da señales de su presencia en el sistema de la madre y prolonga la vida útil del cuerpo luteo. En los rumiantes, el IFN- τ es la señal de reconocimiento de la preñez secretada por el embrión en elongación. Además de su acción antiluteolítica, el IFN- τ actúa sobre el endometrio para inducir o aumentar la expresión de varios genes. (Spencer et al, 2007)

El conceptus ovino debe estar presente en el útero hacia el día 12 o 13 para que haya establecimiento de la preñez. La remoción del conceptus del útero de ovejas antes del día 13 de preñez no tiene efecto sobre la vida media del CL. Si ella se hace después del día 13 se extiende la vida media del CL entre 25-35 días. Se observó un comportamiento similar en la vaca por acción de proteínas colocadas en el útero sintetizadas por el conceptus bovino, entre los días y 21 de la gestación, las cuales incrementaron el intervalo interestro hasta 30-39 días e inhibieron la producción uterina de PGF2 α en respuesta a estradiol exógeno. Así, el reconocimiento materno de la gestación en la oveja y en la vaca ocurre entre los días 12-13 y 16-17 respectivamente. La señal antiluteolítica para el RMP en rumiantes es un nuevo interferón denominado tau (IFN-t), el cual es secretado por el trofoblasto del conceptus éntrelos días 12-21, 12-38 y 17-21 de preñez en la oveja, vaca y cabra respectivamente y ejerce un efecto paracrina en el endometrio para bloquear el mecanismo luteolítico. (Hernández et al., 2008)

Los rumiantes han evolucionado una vía de señalización única para permitir la comunicación con la madre, le informara de su condición de embarazada, y evitar la regresión lútea. (Roberts et al, 2008)

El reconocimiento materno de la preñez es el proceso fisiológico en el cual el embrión, mediante señales moleculares como la secreción de interferón tau (IFN-t), anuncia su presencia en el tracto reproductivo materno, con el fin de evitar que se desencadene el mecanismo luteolítico ejercido por la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) sobre el cuerpo lúteo, prolongando la vida de éste y garantizando la producción de progesterona para el mantenimiento de la preñez. Los eventos que influyen en este proceso fisiológico son una interacción de diferentes órganos como el ovario, útero y embrión. Aunque se considera al IFN-t como la señal primordial para que se dé el reconocimiento materno de la preñez, es importante tener en cuenta el papel que cumplen los estrógenos, progesterona y prostaglandinas en los procesos de señalización molecular que ocurren durante la ventana de implantación. (López & col, 2008)

El interferón-tau (IFNT) es un IFN de tipo I tiene la virtud de controlar la transcripción que limita la expresión del trofoblasto de rumiantes antes de su implantación. Uno de los principales, pero probablemente no el único papel de las citoquinas, es el de silenciar la liberación pulsátil de prostaglandina-F_{2α} (PGF_{2α}) del endometrio uterino materno, por lo tanto, bloqueo de la luteólisis. Curiosamente, al menos 12 diferentes IFNT han sido identificados a partir de conceptus bovinos, a pesar de la aparente responsabilidad singular del mantenimiento de la preñez por las citoquinas. (Rasmussen & Col., 2005, citado por: Walker & Col, 2009)

En comparación con otros IFN de tipo I, la expresión IFNT es única en al menos cuatro aspectos: que se limita a los rumiantes ungulados, hay una falta de inducción viral, la expresión se limita a trofoectodermo y la síntesis de altos niveles se mantiene durante varios días y luego termina. (Roberts et al, 2008)

Las especies de animales domésticos son ovuladoras espontáneas y muestran ciclos estruales que dependen del útero. Una coordinación cercana entre procesos dinámicos en el endometrio uterino y el ovario es decisiva para establecer un ambiente uterino apropiado para la preñez y que coincida con el momento de la receptividad sexual y la ovulación. Después de un apareamiento y una fecundación exitosos, el embrión debe anunciar su presencia al sistema materno y bloquear la regresión del cuerpo lúteo (CL), proceso denominado luteólisis, a fin de mantener la producción lútea de progesterona. La presencia del cuerpo lúteo es esencial para el establecimiento de la preñez en todos los animales domésticos. El embrión sintetiza y secreta esteroides y/o proteínas para señalar su presencia al sistema materno. Estas moléculas sirven para modular la síntesis y/o liberación de prostaglandina F_{2α} luteolítica del útero y evitar la regresión del CL. Durante el periodo crítico de la liberación de PGF_{2α} uterina, el embrión debe cubrir una gran parte del endometrio paterno para regular la producción de PGF_{2α} (Figura 38). (Hafez, 2002)

La preñez generalmente ocurre a pesar de la amenaza inmunológica contra el embrión, debido a que en el trofoblasto está alterada la expresión del antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (HCM), comparada con la mayoría de los tejidos. Además la preñez está asociada con cambios regulados localmente en función de linfocitos endometriales maternos. (Hansen, 1996)

Durante la preñez se crea un ambiente uterino en el cual los tejido maternos y el trofoblasto secretan moléculas linfocito-inmunitarias que disminuyen la reacción inmune. Datos obtenidos en otras

especies sugieren que durante la preñez hay también cambios específicos en la actividad funcional de los linfocitos maternos que llevan a:

- Redireccionar la respuesta inmune más allá de la inmunidad celular.
- Elevar la tolerancia a los antígenos del concepto.
- Activar poblaciones específicas de linfocitos involucrados en la inmunosupresión o liberación de citoquinas que estimulan la función plaquetaria.

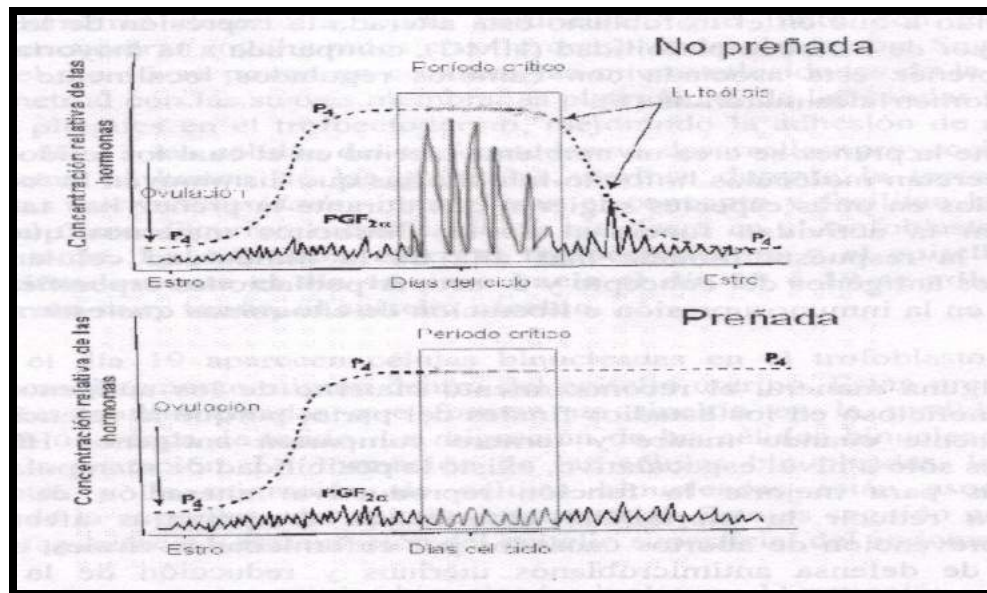
De alguna manera, el reconocimiento materno de los antígenos del conceptus podría ser beneficioso en los estadios finales del parto, porque la retención de placenta es más frecuente cuando madre y ternero comparten antígenos HMC. Aunque actualmente es solo a nivel especulativo, existe la posibilidad de manipular las funciones inmunológicas para mejorar la función reproductiva: alteración de las respuestas inmunes para reducir la mortalidad embrionaria temprana o afectar la función placentaria, prevención de abortos causados por enfermedades virales, aumento de los mecanismos de defensa antimicrobianos uterinos y reducción de la frecuencia de retención placentaria. (Hansen, 1996)

La acción antiluteolítica del embrión se ejerce por medio de una o varias proteínas que pueden bloquear la síntesis de PGF2_α por la mucosa uterina. Estas proteínas, llamadas primeramente antiluteolisinas, luego proteína trofo-blástica bovina, están aparentemente reguladas por el interferon – tau (IFN-t). (Alonso & Caccia, 2007)

El IFN-t es producido por los rumiantes ungulados en las células mononucleadas del trofoectodermo durante el periodo de la implantación. Tiene una acción reguladora sobre la actividad de ciertos genes, activando su transcripción y la síntesis de proteínas que actuarían bloqueando específicamente uno o más pasos de la síntesis de PGF2_α . Su función primaria es informar la presencia del embrión y rescatar el CL de la luteólisis para que se transforme en CL de la gestación; en la vaca esto ocurre aproximadamente el día 16. (Alonso & Caccia, 2007)

La producción de IFNT por el conceptus de las especies bovina y ovina comienza en la fase de blastocisto, cuando en una expresión por célula base es muy baja y luego aumenta a medida que el embrión comienza a elongarse. El comienzo de la elongación del embrión y la producción de IFNT máxima es muy variable de animal a animal, pero se correlaciona con el aumento de las concentraciones de progesterona sérica materna. (Roberts et al, 2008)

Figura 31. Condiciones endocrinas de una hembra preñada y de una no preñada.



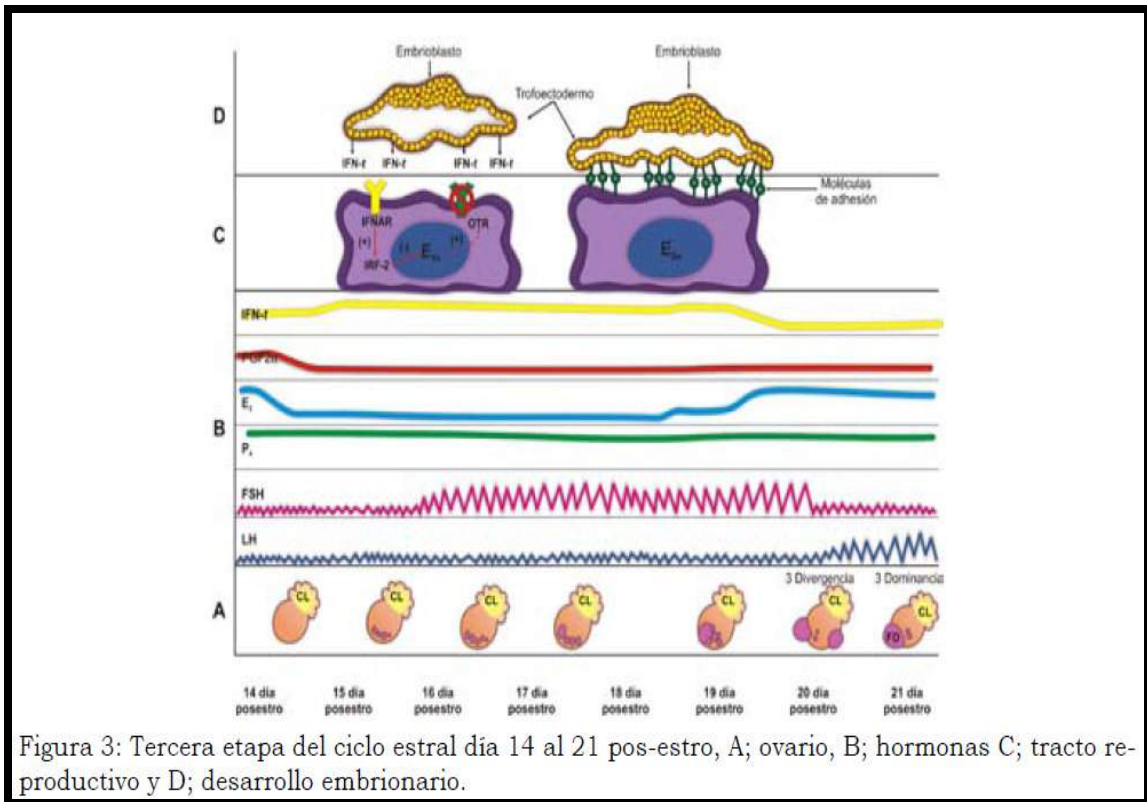
Fuente: Pathways to Pregnancy and Parturition (2001)

Otra proteína que interviene indirectamente en el mantenimiento del CL es la proteína específica de la preñez B (PSPB), que induce secreción de PGE₂, la cual tiene una acción luteotrófica y luteoprotectora. Es secretada por las células binucleadas del ectodermo trofoblástico y su presencia puede ser detectada en sangre de vacas preñadas desde la tercera semana de gestación hasta 8-9 semanas post-parto. El endometrio de vacas preñadas produce un inhibidor de la síntesis de prostaglandina endometrial (EPSI) que específicamente reduce la síntesis de PGF_{2α}. Este inhibidor parece ser el ácido linoleico. La proporción de este ácido con el ácido araquidónico (precursor de PGF_{2α}) es mucho más alta en vacas preñadas que en las no preñadas, lo que sugiere una función importante de las alteraciones en la composición de lípidos del tejido uterino en el reconocimiento materno de la preñez en la vaca. No existe evidencia de un EPSI en la oveja. (Maena & Callejas, 1998)

La mortalidad embrionaria durante el periodo de preimplantación es un elemento clave contribuyente a la reducción de la fertilidad en el ganado bovino, con un máximo de 40% del total de la pérdida de embriones que se sitúa entre Días 8-17 de preñez. (Thatcher & Col., 2001, citado por: Fouladi et al., 2007)

Esta etapa de pérdida embrionaria coincide con el efecto inhibitor del interferón tau (IFNs), producido por células del trofoectodermo de los embriones, sobre la liberación de prostaglandinas del útero. Esto sugiere que una proporción de embriones no son capaces de inhibir F2A prostaglandina (PGF_{2a}) la liberación conduce a la regresión de la CL, la reducción en la producción de progesterona, y la interrupción de la preñez. (Robinson & Col., 2006, citado por: Fouladi et al, 2007)

Figura 32. Tercera etapa del ciclo estral día 14 al 21 posastro



Fuente López Cardona, Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión (2008)

Por lo tanto la calidad del embrión en la etapa de preimplantación, y su capacidad para comunicarse con las células del útero, son fundamentales para el establecimiento y la continuación de la preñez. Cambios a corto plazo en el plano de la nutrición han demostrado tener un efecto directo sobre la dinámica folicular ovárica en el ganado, sin ningún tipo de cambios en las concentraciones circulantes de gonadotropinas. (Webb & Col., 2003, citado por: Fouladi et al, 2007)

3.4.1 Mecanismo de señalización por interferón-tau en las células endometriales

¿Cómo actúa el INF-t como factor antiluteolítico? Inicialmente se creía que el efecto del INF-t se ejercía sobre la expresión del COX-2, enzima importante en la vía de producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$, sin embargo estudios posteriores han demostrado que la inhibición se da en otra parte de la vía propiamente en la síntesis de receptores para la oxitócina (OTR). La células endometriales poseen un receptor membranal para los interferones tipo I llamado IFNAR, el INF-t se acopla a este receptor para inducir una señal intracelular que genera la producción de proteínas tales como el IRF-1 (factor regulador del interferon 1), IRF-2 (factor regulador del interferon 2), proteína Mx, $\beta 2$ microglobulina entre otras. El IRF-2 actúa como inhibidor del receptor de estrógenos ($\text{RE}_{2\alpha}$) en la célula endometrial, evitando la unión hormona-receptor necesaria para la síntesis de OTR, así no habrá receptor que reciba el estímulo para la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$. (López & col, 2008)

Mediante este mecanismo de señalización del INF-t se mantiene la producción de P₄ por el cuerpo lúteo, mientras el embrión continúa con la fase de aposición en los días 18 a 19 pos-estro, donde existe contacto célula a célula. El embrión se inmoviliza en el útero por medio de la integración de las células diferenciadas del trofoectodermo embrionario con las microvellosidades del epitelio endometrial. Finalmente se da la fase de adhesión caracterizada por la fusión de las membranas trofoblástica con membranas de las células endometriales. La adhesión se da gracias a un número de moléculas de adhesión expresadas tanto por las células del trofoectodermo como por las células endometriales, que permiten la unión célula a célula. (López & col, 2008)

3.4.2 Moléculas de adhesión

Las moléculas de adhesión presentes en la membrana celular permiten la unión entre células y median procesos como la embriogénesis, la remodelación de tejidos, la cicatrización y la migración de células. Estas moléculas se clasifican dependiendo del tipo de unión si es célula a célula como las caderinas en inmunoglobulinas o células de la matriz extracelular como integrinas. La producción de moléculas de adhesión en la implantación de embriones bovinos se da tanto en las células del trofoectodermo como en las células endometriales. Las integrinas α y β y L-selectina, son algunas de las moléculas implicadas en el proceso de implantación, se unen a componentes de la matriz extracelular como el GlyCAM-1 (molécula de adhesión celular glicosilada 1), galactin-15 y osteopontina que son secretadas por las células del endometrio. Las moléculas de adhesión se activan dependiendo de diferentes factores como la progesterona (P₄) y el INF-t, también pueden ser activadas por otras moléculas como la unión de L-selectinas a GlyCAM-1 que activan las integrinas β 1 y β 2. (López & col, 2008)

3.5 ACEPTACIÓN INMUNOLÓGICA DEL CONCEPTUS ALOGÉNICO

Se han propuesto varios mecanismos de defensa para evitar el rechazo del trofoblasto por parte de la madre:

- a) La placenta sirve como barrera para el paso de células fetales y maternas.
- b) El trofoblasto tiene una susceptibilidad disminuida a la lisis ejercida por linfocitos citotóxicos aloespecíficos por las células asesinas y macrófagos de los antígenos derivados del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).
- c) El trofoblasto es poco antigénico, pues en el caso de los humanos, por ejemplo, no expresa antígenos clase II del CMH, ni los de la clase I al final de la gestación.
- d) Inmunosupresión local causada por linfocitos, hormonas, prostaglandinas u otros factores secretados por el útero, el trofoblasto o células linfoides. (Hernández et al., 2008)

Actualmente se acepta que existen fenómenos de inmunosupresión frente a los antígenos paternos que porta el conceptus, como un mecanismo de tolerancia inmunológica. Se ha postulado que la P₄ tiene acción en este sentido, aunque ha sido cuestionada. (Low & Hansen, 1988 citado por: Hernández et al., 2008)

Se han observado cambios en la morfología de los linfocitos granulares durante la implantación en primates los cuales podrían estar relacionados con los mecanismos de inhibición de la respuesta

inmune. Estos linfocitos granulares intraepiteliales del útero de la oveja, aparecen metabólicamente activos desde la mitad de la gestación hacia adelante y pueden desempeñar algún papel en la preñez o el parto. (Lee & col., 1992 citado por: Hernández et al., 2008)

En conclusión se ha propuesto que la aceptación inmunológica del conceptus bovino puede explicarse parcialmente, porque hay una expresión reducida de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en la superficie del conceptus. Así mismo, tanto el trofoblasto como el útero secretan sustancias que inhiben la acción de los linfocitos para disminuir la reactividad inmunológica. Posiblemente, como sucede en otras especies, hay una baja respuesta celular inmune y tolerancia temporal a los antígenos del conceptus. Por otro lado, durante la gestación, hay activación de linfocitos comprometidos con la inmunosupresión o liberación de citoquinas que estimulan la función placentaria. Al final de la gestación, el reconocimiento de antígeno puede tener algún beneficio, puesto que la retención de placenta es más frecuente cuando el feto y la madre comparten los antígenos tipo I del CMH. (Hansen., 1997 citado por: Hernández et al., 2008)

CONCLUSIONES

- En casi todas las especies de mamíferos no hay división mitótica de la célula germinal femenina después del nacimiento, de manera que, el número de ovocitos presentes al nacimiento representa el total disponible durante la vida del animal.
- Los folículos primordiales inician su crecimiento y diferenciación en un proceso aparentemente continuo pero irreversible que es conocido como foliculogénesis. Cuando un folículo primordial entra al grupo de crecimiento, este será conducido a uno de dos hechos: la degeneración por atresia (sufrida por el 99% o más) o la ovulación alcanzada por muy pocos. El intervalo requerido para la activación de un folículo primordial durmiente hasta su ovulación ha sido estimado en 180 días.
- Cuando la capa de células de la granulosa se transforma de aplanadas a cuboidales y la teca interna comienza su diferenciación, al folículo en desarrollo se le denomina folículo primario. Su crecimiento al siguiente estadio, que es el de folículo secundario, se completa por la proliferación de las células de la granulosa. Los folículos en estos dos estadios se describen colectivamente como preantrales. La formación de la cavidad del folículo que forma el antro líquido es el siguiente estadio en su desarrollo. Los folículos antrales existen en el ovario bovino con diámetros comprendidos en el rango de 0.1 a 20 mm. Generalmente se acepta que la formación del antro es un evento influenciado por las gonadotropinas y que la FSH es la principal hormona responsable.
- Una onda de desarrollo folicular se puede definir como el desarrollo armónico y simultáneo de varios folículos antrales pequeños, en promedio 24 por onda con un rango de 8 a 41, funcionando a través de estadios integrados de reclutamiento, selección y dominancia folicular.
- La actividad reproductiva se determina y clasifica a partir del conocimiento de la dinámica de la función ovárica, de la concentración de hormonas reproductivas circulantes, de la fisiología molecular y celular, y de las interacciones fisiológicas que son el fundamento de las condiciones ovulatorias y anovulatorias.
- En el mecanismo molecular de la ovulación, esta involucrado el pico preovulatorio de LH que provoca cambios en la estructura del folículo, en la actividad proliferativa y en la esteroidogénesis de las células de la granulosa.
- El desarrollo completo del cuerpo lúteo toma aproximadamente tres días (Día 2 a 5 del ciclo). A pesar de que algunos folículos comienzan a crecer el Día 1 del ciclo, la progesterona secretada por un cuerpo lúteo activo evita que ellos maduren y por lo tanto se degeneren. Durante los días 16 a 18 del ciclo, si el útero no ha detectado la presencia de un embrión, manda una señal hormonal (prostaglandinas) que produce la regresión del cuerpo lúteo. Esta regresión remueve la inhibición de las fases finales del crecimiento folicular y le permite al folículo dominante completar su maduración. Esto conduce a un nuevo celo y al comienzo de un nuevo ciclo.

- La fertilización es la unión de un óvulo y un espermatozoide para producir la primera célula del embrión. La fertilización toma lugar en el oviducto. El embrión entra al útero dos a tres días luego de la fertilización.
- La célula original, normalmente el óvulo fecundado, provisto de una cierta cantidad de vitelo, inicia su desarrollo mediante una segmentación en la que la célula original se divide repetidas veces, nutriéndose a partir de sus propias reservas.
- El cigoto formado en la fecundación, se divide dando dos células hijas o blastómeros, luego cada uno de éstos se segmentan según un plano perpendicular al primer plano de división, quedando un estadio de 4 blastómeros. Continúa el proceso de segmentación con sucesivas divisiones y cuando se llega a un número determinado de blastómeros que depende de la especie y generalmente no más de 128, queda una estructura que recuerda el aspecto de una mora o mórula, sin que se haya producido aumento de tamaño.
- La implantación consiste en la formación de cerca de 80 a 100 estructuras donde el tejido fetal (cotiledón) y el tejido materno (carúnculas) se pliegan juntos.
- El reconocimiento materno de la preñez es el proceso fisiológico en el cual el embrión, mediante señales moleculares como la secreción de Interferón tau (INF-t), anuncia su presencia en el tracto reproductivo materno, con el fin de evitar que se desencadene el mecanismo luteolítico ejercido por la prostaglandina F2 α (PGF2 α) sobre el cuerpo lúteo, prolongando la vida de éste y garantizando la producción de progesterona para el mantenimiento de la preñez.
- Entre los días 12 a 16, el embrión deberá secretar grandes cantidades de Interferón t para mantener el CL activo e impedir la secreción del factor luteolítico (PGF2 α), por lo tanto existe íntima relación P4 e Interferón t, lo que redundará en un buen desarrollo embrional.
- Las hembras que presentan pronta alza de P4 inmediatamente después de la ovulación, permiten al embrión secretar adecuadas cantidades de Interferón t, por lo cual éste sobrevivirá, caso contrario en el cual la secreción de P4 es lenta, la producción de Interferón será menor y el cigoto morirá, siendo absorbido; lo anterior permite afirmar que ciclos interestrales disclícos prolongados (irregulares) indican muerte del embrión; aquí tampoco podemos descartar una serie de enfermedades reproductivas, especialmente DVB, IBR, campilobacteriosis y trichomoniasis, además de una pobre condición corporal (< 2.50), lo que indica deficiencia energética del animal (disminución de la actividad secretora del CL).

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS G.P., JAISWAL R., SINGH J., MALHI P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle, *Theriogenology* 69 (2008) 72–80
- ALBARRACÍN MONJE JOSÉ LUIS, *Vitrificación de Ovocitos Bovinos Mediante la Técnica Open Pulled: Tesis Doctoral. España 2005. Uni. Aut. De Barcelona. p. 13, 14, 16*
- ALONSO, ARMONIA. CACCIA, MARIANA. *Fisiología de la Reproducción de la Vaca: IRAC. 2007. p. 101*
- ANDRADE, ROY, MANRIQUE A, FRED, PETERS, KART, *Características productivas y de gestión de fincas lecheras en Boyacá: Rev.MVZ Cordoba 2008 vol.13 no.2.*
- BEDFORD JM. *Fertilization, in: Reproduction in Mammals, Book 1. Germ cells and fertilization, Austin CL and Short RV. Cambridge U. Press. 1982.*
- BLOMBERG LEANN, HASHIZUME KAZUYOSHI AND VIEBAHN CHRISTOPH. *Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation. Reproduction (2008) 135 181–195*
- BUFFONE MARIANO G., RODRIGUEZ ESMERALDA, STOREY BAYARD T., AND GERTON GEORGE L. *Acrosomal Exocytosis of Mouse Sperm Progresses in a Consistent Direction in Response to Zona Pellucida. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY (2009) 611-620*
- BUXADÉ C. CARLOS. *Estructura, Etnología, anatomía y fisiología: Mundi-Prensa, 1995 p. 235*
- CASTRO R. ALVARO. *Ganadería de leche: Enfoque empresarial: Mexico D F 2002, EUNED. p. 153*
- CERRI R. L. A., JUCHEM S. O., CHEBEL R. C., RUTIGLIANO H. M., BRUNO R. G. S., GALVÃO K. N., THATCHER W. W., AND SANTOS J. E. P. *Effect Of Fat Source Differing In Fatty Acid Profile On Metabolic Parameters, Fertilization, And Embryo Quality In High-Producing Dairy Cows: Journal of Dairy Science Vol. 92 No. 4, 2009*
- CUNNINGHAM. JAMES G. *Fisiología Veterinaria: 3ª ed. España, 2003. Elsevier p. 421*

- DEJARNETTE M. NEBEL R. Anatomía y Fisiología de la Reproducción Bovina: 2007. Select Reproductive Solutions. p. 1
- DURANTHON VERONIQUE, J WATSON ANDREW, AND LONERGAN PATRICK, Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment: *Reproduction*, Feb 2008; p. 135, 141 – 150
- FOULADI-NASHTA ALI A., GUTIERREZ CARLOS G., GONG JIN G., GARNSWORTHY PHILIP C., AND WEBB ROBERT, Impact of Dietary Fatty Acids on Oocyte Quality and Development in Lactating Dairy Cows: *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (2007) 77, 9–17
- GABLER, S. ODAU, K. MULLER, J. SCHON, A. BONDZIO, R. EINSPANIER, Exploring Cumulus-Oocyte-Complex-Oviductal Cell Interactions: Gene Profiling In The Bovine Oviduct: *Journal Of Physiology and Pharmacology* 2008, 59, Suppl 9, 29–42
- GALINA CARLOS. VALENCIA JAVIER. Reproducción de animales domésticos: México, Segunda Edición, Limusa, , 2006. p. 128, 130, 135, 136
- GIGLI, I; RUSSO, A.; AGÜERO,A. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y Camélidos sudamericanos: 2006, Volumen 8, número 1: p. 3 – 18.
- HAFEZ, E.S.E. HAFEZ. B. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales: Ed. McGraw-Hill Interamericana, Séptima edición, 2002. p. 5-137
- HANSEN, P.J. AND W- J-LIU. Immunological aspects of pregnancy: concepts and speculations using the sheep as a model: 13th International Congress on Animal Reproduction. Sidney, Australia. *Anim Reprod Sci* 1996. 42:483-493.
- HENAO DAMARY; CARRILLO LINA; OLIVERA MARTHA; Comportamiento durante el calor y dinámica folicular interestral en vacas BON (Blanco Orejinegro): *Rev Col Cienc Pec Vol. 17:1*, 2004 p. 39
- HENAO R. GUILLERMO. TRUJILLO A LUIS E. Establecimiento Y Desarrollo De La Dominancia Folicular Bovina: *Rev. Col. de Cien. Pec. Vol. 13 No.2* (2000). p. 118-120
- HERNANDEZ V. AURELIANO, GÓNGORA O. AGUSTÍN, JIMÉNEZ E, CLAUDIA, RODRÍGUEZ M. JOSÉ M, PRIETO M. ESPERANZA, CHACÓN J. LILIANA, ESCOBAR C. FERNANDO, Reproducción en la Vaca Fisiología y Aplicaciones: Ed. UNAL, Primera Edición, 2008 p. 7-115
- HOLY, LB. Bases Biologicas de la Reproduccion Bovina: Cap. 13: 190. Ed. Diana. 1983.

- J GONZÁLEZ-MERLO. *Obstetricia*: 5ª ed. Elsevier España, 2006. p. 26
- J.K. FINDLAY, J.B. KERR, K. BRITT, S.H. LIEW, E.R. SIMPSON, D. ROSAIRO, A. DRUMMOND, *Ovarian Physiology: Follicle Development, Oocyte And Hormone Relationships: Anim. Reprod.* (2009), v.6, n.1, p.16-19.
- JANICE P. EVANS, *Egg Integrins: Back in the Game of Mammalian Fertilization: ACS Chemical Biology VOL.4 NO.5 • 321–323 • 2009*
- KENNEDY THOMAS G, GILLIO-MEINA CAROLINA, AND HAN PHANG SEN, *Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization: Reproduction*, Nov 2007; 134: 635 - 643
- LEE KYUNG-BON, BETTEGOWDA ANILKUMAR, WEE GABBINE, IRELAND JAMES J., AND SMITH GEORGE W. *Molecular Determinants of Oocyte Competence: Potential Functional Role for Maternal (Oocyte-Derived) Follistatin in Promoting Bovine Early Embryogenesis. Endocrinology*, May 2009, 150(5):2463–2471
- LOPEZ AP,GOMEZ LF, RUIZ CORTES ZT, OLIVERA M,GIRALDO CA, *Reconocimiento Materno de la Preñez e Implantación del Embrión: Modelo Bovino: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia*, 2008; 28 (1): 42: 47
- MAENA IRIGOYEN, G. Y CALLEJAS, S. *Reconocimiento materno de la preñez en rumiantes: Revista CABIA*, 1998. 34: 18-27.
- MIHM M and EVANS ACO. *Mechanisms for Dominant Follicle Selection in Monovulatory Species: A Comparison of Morphological, Endocrine and Intraovarian Events in Cows, Mares and Women. Reprod Dom Anim* 43 (Suppl. 2), 48–56 (2008)
- OLIVERA MARTHA; RUIZ TATIANA, TARAZONA ARIEL; GIRALDO CARLOS; *El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización: Rev Col Cienc Pec Vol. 19:4, 2006, p. 427*
- ORASMA L. CARLOS. BARRERAS S. ALBERTO. *Transferencia no quirúrgica de embriones en el ganado bovino: UABC. p. 25,26,28*
- PALMA. GUSTAVO A. *Biología de la Reproducción: Gustavo Palma*, 2001. p. 62, 37
- PEÑA J. MIGUEL. GONGORA O. AGUSTÍN. ESTRADA L. JOSE. *Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación en la producción de embriones bovinos: Rev. MVZ Cordoba* 12(1): 2007. p. 942-954.

- PEROZO EUDOMAR, VALERIS ROBERT, RIERA MARIO, RODRÍGUEZ JOSÉ M., CÉSPEDES RAQUEL, Irrigación Arterial del Ovario en la Oveja y la Vaca Durante el Ciclo Estral: Revista Científica, FCV-LUZ/vol. XVI. No 5. 2006, p. 472-480
- Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana 2019, Federación Colombiana de Ganaderos – FEDEGAN – FNG, 2006, p. 29-175
- REKAWIECKI R., KOWALIK M.K., SLONINA D., KOTWICA J., Regulation Of Progesterone Synthesis And Action In Bovine Corpus Luteum: Journal Of Physiology and Pharmacology 2008, 59, Suppl 9, 75-89
- ROBERTS R. MICHAEL, CHEN YIZHEN, EZASHI TOSHIHIKO, WALKER ANGELA M. Interferons and the maternal–conceptus dialog in mammals. Seminars in Cell & Developmental Biology 19 (2008) 170–177
- ROBINSON R. S., PUSHPAKUMARA P. G. A., CHENG Z., PETERS A. R., ABAYASEKARA D. R. E. AND WATHES D. C., Effects Of Dietary Polyunsaturated Fatty Acids On Ovarian And Uterine Function In Lactating Dairy Cows: Reproduction (2002) 124, 119–131
- SANJOY K DAS, Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation: Reproduction, Jun 2009; 137: 889 – 899
- SCHROEDER W, HANS. Fisiopatología Reproductiva de la Vaca: Librería Medica CELSUS, 1999. P. 235-238
- SINGH J. BROGLIATTI G. M. CHRISTENSEN C. R. ADAMS G. P. Active immunization against follistatin and its effect on FSH, follicle development and superovulation in haifers. Theriogenology 52 (1999) 49-66
- SPENCER THOMAS E., JOHNSON GREG A., BAZER FULLER W., BURGHARDT ROBERT C. AND PALMARINI MASSIMO. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. Reproduction, Fertility and Development, 2007, 19, 65–78
- SURANGA P. KODITHUWAKKU. AKIO MIYAMOTO. Spermatozoa stimulate prostaglandin synthesis and secretion in bovine oviductal epithelial cells En: Reproduction. 2007. 133. p. 1087-1094.

- THANGAVELU G., COLAZO M.G., AMBROSE D.J., OBA M., OKINE E.K., DYCK M.K., Diets Enriched In Unsaturated Fatty Acids Enhance Early Embryonic Development In Lactating Holstein Cows: *Theriogenology* 68 (2007) 949–957
- THATCHER, W. W. M. BIENLLI, J. BURKE, C.R. STAPLES, J.D. AMBROSE y S. COELHO. Reconocimiento materno de la preñez en Bovinos: Segundo simposio Internacional de Reproducción Animal. Carlos Paz, Córdoba, 1996. 1: 145.
- THOMAS FIONA H, CAMPBELL BRUCE K, ARMSTRONG DAVID G AND TELFER EVELYN E. Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development in vitro. *Reproduction* (2007) 133 1121–1128
- VELÁSQUEZ PENAGOS, JOSÉ GUILLERMO. Estudio del reconocimiento y la unión entre gametos en la especie bovina (*Bos taurus*). Papel del ácido siálico en la interacción espermatozoide-zona pelúcida: Tesis Doctoral, 2004, p. 53-60
- WALKER ANGELA M., KIMURA KOJI, ROBERTS R. MICHAEL, Expression Of Bovine Interferon-Tau Variants According To Sex And Age Of Conceptuses: *Theriogenology* 72 (2009) 44–53
- YAO Y.Q., YEUNG W.S.B. AND HO P.C. The factors affecting sperm binding to the zona pellucida in the hemizona binding assay. *Human Reproduction* vol 11 no 7 pp 1516-1519, 1996
- ZHOU GUANG-BIN, LIU GUO-SHI, MENG QING-GANG, LIU YING, HOU YUN-PENG. Tetraspanin CD9 in bovine oocytes and its role in fertilization. *Journal of Reproduction and Development*. Vol. 55 No. 3, 2009