



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE PRODUCCIÓN *in vivo* DE EMBRIONES
BOVINOS.”

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JUANA ACEVEDO LÓPEZ

ASESORES:

Dr. en C. Rafael Cano Torres

Dra. en C. Yazmín Elizabeth Felipe Pérez

Dr. en C. Nazario Pescador Salas



Toluca México, Junio de 2016.

ii. DEDICATORIAS

A Dios que me dio la dicha de vivir, para realizar mis sueños y lograr este tipo de metas que en la vida son únicas. Sé que Dios siempre está presente en cada alegría y tristeza es mi guía para levantarme de cada tropiezo pero sobretodo me bendice cada día.

A mis Padres porque ellos son los seres que más amo, son un gran tesoro en mi vida, a mis Hermanos y Sobrinos por ser parte de mi vida, con ustedes he pasado momentos inolvidables, los llevo siempre en el corazón.

A Eli siempre incondicional y amiga, maná te extraño en casita.

iii. AGRADECIMIENTOS

1. Universidad Autónoma del Estado de México por ser la Institución Formadora de Profesionales que merecen todo el reconocimiento institucional.
2. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por darme la satisfacción de aprender de sus profesores, porque en sus instalaciones pase horas de estudio que ahora sé que no son suficientes para ser un profesional sobresaliente lo cual me motiva para seguir preparándome.
3. Universidad Nacional de La Plata, Argentina en especial a la Facultad de Ciencias Veterinarias, por haberme dado la oportunidad de tomar clases en sus aulas con profesores que merecen todo mi respeto y admiración por su dedicación pero sobre todo por su preparación profesional, los llevaré presentes siempre, de igual manera agradezco a los alumnos que me apoyaron en momentos difíciles.

iv. RESUMEN

El uso de las biotecnologías de la reproducción animal tiene como objetivo principal el hacer más rentables todas las unidades de producción. Es por ello que la producción *in vivo* de embriones bovinos, surge con la finalidad de producir una mayor cantidad de animales seleccionados con elevada calidad genética, dentro del menor tiempo posible.

La información presentada, se recabó a través de la búsqueda y análisis de literatura en diferentes fuentes especializadas. Este manual tiene como objetivo el brindar información clara y suficiente para que el lector conozca los diferentes aspectos a considerar, para poder aplicar las biotecnologías que implica la producción *in vivo* de embriones bovinos.

La información presentada abarca desde los inicios de la puesta en marcha de las primeras biotecnologías reproductivas que se desarrollaron previamente, hasta lograr la puesta en marcha de los programas de transferencia embrionaria en una unidad productiva.

ÍNDICE

II. DEDICATORIAS	III
III. AGRADECIMIENTOS.....	IV
IV. RESUMEN	V
VI. ÍNDICE DE CUADROS.....	VIII
VII. ÍNDICE DE FÍGURAS.....	IX
VIII. ABREVIATURAS	X
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 DESARROLLO DE MÉTODOS DE SINCRONIZACIÓN.....	4
2.2 APLICACIÓN DE EMBRIONES CONGELADOS.....	5
2.3 PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VIVO.....	6
2.4 ANATOMÍA REPRODUCTIVA DE LA VACA.	6
2.5 FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA.....	7
2.6 CICLO ESTRAL DE LA VACA.	8
2.7 SINCRONIZACIÓN DE ESTRO.....	9
2.8 SUPEROVULACIÓN.....	13
2.9 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.	14
2.10. LAVADO DE EMBRIONES.....	15
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. OBJETIVOS	19
GENERAL.....	19
ESPECÍFICO.....	19
V. MÉTODO.....	20
A. SELECCIÓN DE LA DONADORA.....	20
B. SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACIÓN.....	22
C. SUPEROVULACIÓN.....	23
D. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	24
E. LAVADO DE EMBRIONES.....	31

F. MANIPULACIÓN DE EMBRIONES	36
G. CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES	37
H. ESTADOS DE DESARROLLO DEL EMBRIÓN.....	37
I. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA.....	39
MATERIAL.....	41
1.BIOLÓGICO	41
2.INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	41
3.LAVADO DE EMBRIONES.....	42
J. COSTOS ESTIMADOS.	42
VI. CONCLUSIONES	44
VII. RECOMENDACIONES.....	45
VIII. LÍMITE DE ESPACIO.....	46
IX. LÍMITE DE TIEMPO	47
X. LITERATURA CITADA	48
XI. ANEXOS	55
A. LISTA DE COTEJO PARA SELECCIÓN DE LA VACA DONADORA.	55
B. LISTA DE COTEJO PARA SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACIÓN.	55
C. LISTA DE COTEJO PARA SUPEROVULACIÓN.....	56
D. LISTA DE COTEJO PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	56
E. LISTA DE COTEJO PARA LAVADO DE EMBRIONES.....	57
F. EVALUACIÓN DE EMBRIONES.	58

vi. ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1	BIOTECNOLOGÍAS DE LA REPRODUCCIÓN.....	3
CUADRO 2	EJEMPLO DE UN TRATAMIENTO DE SUPEROVULACIÓN.....	13
CUADRO 3	SUPEROVULACIÓN CON PLUSET®.....	23
CUADRO 4	SUPEROVULACIÓN CON FOLLTROPIN®.....	23
CUADRO 5	ESTADOS DE DESARROLLO DEL EMBRIÓN.....	37
CUADRO 6	CALIDAD EMBRIONARIA PARA TRANSFERENCIA O CRIOPRESERVACIÓN.	39
CUADRO 7	COSTO ESTIMADOS DE PRODUCCIÓN <i>IN VIVO</i> DE EMBRIONES.....	43

vii. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	ANATOMÍA REPRODUCTIVA.....	7
FIGURA 2	DETECCIÓN VISUAL DE ESTRO.....	11
FIGURA 3	DESARROLLO EMBRIONARIO.....	16
FIGURA 4	OVARIOS CON FOLÍCULOS.....	22
FIGURA 5	OVSYNCH.....	22
FIGURA 6	TERMO CRIOGÉNICO.....	24
FIGURA 7	PAJILLA DE SEMEN.....	25
FIGURA 8	PISTOLA DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	25
FIGURA 9	PAJILLA CON TOALLA DE PAPEL.....	26
FIGURA 10	CORTE DE LA PAJILLA.....	26
FIGURA 11	PAJILLA DESCONGELADA.....	27
FIGURA 12	FUNDA DESECHABLE Y CAMISA SANITARIA.....	27
FIGURA 13	LIMPIEZA EXTERNA DE LA VULVA.....	28
FIGURA 14	INTRODUCIR LA PISTOLA DE INSEMINACIÓN.....	28
FIGURA 15	TÉCNICA DE INSERCIÓN.....	29
FIGURA 16	PISTOLA DE INSEMINACIÓN EN LA ENTRADA AL CÉRVIX.....	29
FIGURA 17	ANILLOS CERVICALES.....	30
FIGURA 18	EXTRACCIÓN DE LA CAMISA SANITARIA.....	30
FIGURA 19	INYECCIÓN DE SEMEN.....	31
FIGURA 20	APLICACIÓN DE LIDOCAINA.....	32
FIGURA 21	PALPACIÓN RECTAL.....	32
FIGURA 22	LIMPIEZA DE LA REGIÓN PERINEAL.....	33
FIGURA 23	SONDA TIPO FOLEY.....	33
FIGURA 24	INTRODUCCIÓN DE LA PISTOLA TIPO FOLEY.....	34
FIGURA 25	GLOBO DE LA Sonda TIPO FOLEY.....	34
FIGURA 26	COMEXIÓN DE LA Sonda TIPO FOLEY CON LA MANGUERA TYGON.....	35
FIGURA 27	CONEXIÓN DE LA MANGUERA TYGON.....	35
FIGURA 28	MEDIO DE LAVADO VIGRO.....	36
FIGURA 29	FILTRO DE RECOLECCIÓN DE EMBRIONES.....	36

viii. ABREVIATURAS

AETE	Asociación Europea de Transferencia Embrionaria.
E₂	Estradiol
FSH	Hormona Folículo Estimulante
FSH-p	Hormona Folículo Estimulante Porcina
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
IA	Inseminación Artificial
IATF	Inseminación Artificial a Tiempo Fijo
LH	Hormona Luteinizante
NL₂	Nitrógeno Líquido
P4	Progesterona
PGF2α	Prostaglandina F2 α
PMSG o eCG	Gonadotropina Sérica de Yegua Preñada (por sus siglas en Inglés Pregnant Mare Serum Gonadotropin)
PV	Peso vivo
TE	Transferencia de Embriones
UF/IFAS	University of Florida/Institute of Food and Agricultural Sciences

I. INTRODUCCIÓN

La primera transferencia de un embrión de la especie bovina fue reportada por Unbaugh en el año de 1949 y el nacimiento del primer becerro producto de la transferencia de embriones fue dos años después (Willet *et al.*, 1951). La aplicación de la transferencia de embriones con todas las biotecnologías que implica, se inició en la década de 1970, cuando el sistema de producción de ganado bovino doble propósito de Europa se hizo popular en Norte América, Australia y Nueva Zelanda (Seidel y Seidel, 1991).

La técnica de transferencia embrionaria fue establecida alrededor de los años setenta. Inicialmente, era exclusivamente quirúrgica, sin embargo, hacia los años ochenta la mayoría de embriones eran transferidos mediante la técnica no quirúrgica (Jones y Lamb, 2008).

La transferencia de embriones ha pasado a ser un instrumento fiable en la cría animal de los últimos tiempos. Su realización se ha convertido en rutina para veterinarios que trabajan en transferencia de embriones que junto con biotecnologías asociadas, ha alcanzado una posición clave como tecnología en reproducción y producción animal sin la que la cría animal de vanguardia ya no es concebible en las grandes unidades de producción y sobre todo en donde producen su propia genética (Duran, 2010).

Los bovinos son animales poliéstricos y muestran un comportamiento estral cada 21 días, el ciclo estral es regulado por el hipotálamo (hormona liberadora de gonadotropina; GnRH), la adenohipófisis (hormona folículo estimulante, FSH y hormona luteinizante, LH), ovarios (progesterona; P4, estradiol; E₂ e inhibinas) y el útero (prostaglandina PGF_{2α}) estas hormonas funcionan mediante un sistema de retroalimentación positiva y negativa para regular el ciclo estral de ganado (Forde *et al.*, 2011).

El ciclo estral tiene una duración de 18 a 24 días, se compone de una fase lútea (14-18 días) y una fase folicular (4-6 días). Durante el ciclo hay 2 oleadas de crecimiento folicular en vacas lecheras y 3 en novillas y vacas productoras de

carne. Cada oleada de crecimiento folicular consiste en un período de producción folicular, selección de un folículo dominante o atresia y ovulación del folículo dominante (Forde *et al.*, 2011).

La sincronización del estro es una estrategia para mejorar el manejo reproductivo y facilita el uso de la inseminación artificial necesaria en cualquier esquema de mejoramiento genético, aumentando la tasa de gestación que resulta en una reducción en la proporción de vacas al sacrificio (Lane *et al.*, 2008).

Se ha intensificado el uso de la transferencia de embriones en los últimos años, con cifras que duplican la cantidad de transferencias realizadas en la década de los años 90, situación que refleja la tendencia de la TE en el mundo. La tendencia actual es conocer paso a paso como se componen los costos y la forma de optimizarlos, para contar con más herramientas y ser más innovadores (González, 2015).

La mayoría de las empresas ganaderas que utilizan la transferencia de embriones no hacen un seguimiento de los costos reales del programa, o si los hacen no los publican, ya sea porque lo impiden las alianzas estratégicas entre clientes y empresas proveedoras del servicio, o porque desconocen la manera de hacer los análisis de costos. Antes de invertir en tecnologías como la TE, que normalmente tiene un alto costo, es fundamental que los profesionales que asesoren al ganadero en la parte veterinaria y zootécnica, analicen muy bien el retorno de la inversión ya que muchas veces no se obtienen ni los resultados ni la rentabilidad esperado. Esta apreciación cobra mayor fuerza si se tiene en cuenta que en el mercado internacional se pueden obtener embriones de buena procedencia (razas y ejemplares) a precios muy competitivos, lo cual debe ser otro factor a considerar al momento de establecer un programa de TE (Ruvuna, 1992; Smeaton, 2003).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

La transferencia de embriones en 1971 quedó como un instrumento de laboratorio para estudiar la reproducción, en 1980 Heape reportó por primera vez la transferencia de un embrión de conejo del tracto reproductivo de una hembra al de otra. Para llegar a ser lo que es hoy en día esta biotecnología, han tenido que pasar años de investigación en todas las biotecnologías involucradas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Biotecnologías de la reproducción.

Avances en el desarrollo de la ciencia reproductiva en bovinos (Thibier, 1990).

GENERACIÓN	PRIMERA 1784 – 1899 1ª Inseminación artificial exitosa en perros por Abbe Lazzaro Spallanzani y establecimiento práctico en Rusia por Ivanov.
	SEGUNDA 1970 Control hormonal de la ovulación. Transferencia de embriones congelación, división. 540,000 embriones/año.
	TERCERA 1980 Sexado de embriones y espermatozoides. 30,000 terneros nacidos.
	CUARTA 1990 Producción <i>in vitro</i> de embriones. 106,000 embriones/año.
	QUINTA 2000 Transgénesis, Gene Farming, Células Madre.

Cuando las razas Europeas de doble propósito como Limousin y Simmental se pusieron de moda en Norte América, Australia y Nueva Zelanda, los intereses ganaderos ofrecieron grandes incentivos económicos a veterinarios y personas dedicadas a la ciencia animal para desarrollar la transferencia de embriones como instrumento de reproducción. Fue así que la tecnología de la transferencia de embriones se desarrolló como un producto comercial y no con fondos para investigación que provinieran del gobierno, sino con recursos de los criadores de

ganado. La demanda sobrepasó la sofisticación y madurez de la tecnología, el valor genético de las donadoras y el efecto de la tecnología en la normalidad de las crías no se puso en duda (Patterson *et al.*, 2003).

El 90% de la actividad comercial de transferencia de embriones ha sido hecha en ganado bovino. Sin embargo, el potencial de la técnica ha captado entusiasmo e imaginación de criadores de otras especies y conservacionistas preocupados por preservar especies en peligro de extinción. Debido a estos avances surgió la necesidad de encontrar técnicas que permitieran preservar embriones, siendo la criopreservación la técnica más adecuada ya que ha permitido almacenar indefinidamente material biológico de diversas especies sin pérdida de actividad y funciones genéticas (He *et al.*, 2008).

La producción *in vivo* de embriones consiste en la aplicación de un tratamiento hormonal a una vaca donadora para inducir la ovulación múltiple, inseminar y recolectar los embriones. En 1979, más de 17,000 preñeces fueron registradas en Norte América como resultado de la producción y transferencia de embriones bovinos. El crecimiento continuo de la industria parece asegurado, ya que la transferencia de embriones es un paso clave para tecnologías en desarrollo. (Seidel y Seidel, 1991).

Los embriones producidos *in vivo*, tienen como ventaja una mayor tasa de gestación con respecto a los producidos *in vitro*. La cantidad de progenie producida por transferencia de embriones en bovinos es asombrosa, por ejemplo, el número de preñeces por superovulación va de 0 a 20 o más y algunas vacas han tenido hasta 50 crías al año (Farin y Farin, 1995; Farin *et al.*, 1999).

2.1 DESARROLLO DE MÉTODOS DE SINCRONIZACIÓN.

Ha ocurrido en 6 fases:

1. La base fisiológica para la sincronización del estro así como el descubrimiento de que la progesterona inhibe la ovulación y la maduración folicular preovulatoria (Ulberg *et al.*, 1951). Incluye esfuerzos por prolongar

la fase luteal del ciclo estral o para establecer una fase artificial mediante la administración de progesterona exógena.

2. La regulación del ciclo estral fue asociado con el control del cuerpo lúteo con un ciclo de vida y actividad secretora regulados por mecanismos tróficos y líticos (Thimonier *et al.*, 1975; Patterson *et al.*, 2003).
3. La combinación de los progestágenos con los estrógenos o gonadotropinas en la fase progesterona–estrógenos (Nellore y Cole, 1956).
4. La $PGF_{2\alpha}$ y sus análogos fueron reportados en 1972 como agentes luteolíticos en bovinos marcando el comienzo de la fase de las prostaglandinas. Los tratamientos que combinan progestágenos con prostaglandinas caracterizan la fase progestágeno-prostaglandina.
5. Los protocolos se dirigieron a controlar la fase luteal ya que las ondas foliculares no fueron reconocidas en ese momento (Hansel *et al.*, 1961). El monitoreo preciso de los folículos ováricos y el cuerpo lúteo en el tiempo por ecografía transrectal desarrolló la comprensión del ciclo estral particularmente los cambios que ocurren durante una onda folicular.
6. El control preciso del ciclo estral requiere la manipulación de las dos ondas foliculares y la vida útil del cuerpo lúteo fase GnRH- $PGF_{2\alpha}$ (Lamond, 1964). El crecimiento de los folículos ocurre en distintos patrones de onda, con nuevas oleadas foliculares que ocurren aproximadamente cada 10 días (rango 6-15 días).

2.2 APLICACIÓN DE EMBRIONES CONGELADOS.

La aplicación de embriones congelados posibilita la eficiencia de las vacas donantes y las vacas receptoras; incorporando progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie; transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia; controlar enfermedades exóticas y crear bancos de embriones de gran valor pecuario. Los registros de la Sociedad

Internacional de Transferencia de Embriones revelan que más del 50% de 500,000 embriones de bovinos transferidos en los últimos años han sido usados después de ser congelados y descongelados (Thiber, 1990).

2.3 PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VIVO.

La producción de embriones *in vivo* desarrollada al inicio de 1970 está basada en la superestimulación del ovario para provocar una ovulación múltiple en las hembras donantes, en lugar de la ovulación sencilla que tiene lugar de forma natural. Las hembras se inseminan y los embriones se desarrollan en el útero, hasta que se extraen por medio de un lavado uterino que se realiza 7 días después de la última inseminación (Machaty *et al.*, 2012).

Los embriones extraídos pueden transferirse a hembras receptoras que llevarán la gestación a término, o someterse a procesos de criopreservación, para ser utilizados posteriormente. De estos procesos, la congelación es la más adecuada para los embriones producidos *in vivo*.

Inicialmente los procedimientos de extracción y de transferencia de embriones se realizaban de forma quirúrgica, pero desde los años ochenta se usan procedimientos de lavado uterino y transferencia no quirúrgicos (vía transcervical), lo que ha permitido la difusión de la técnica. En Europa durante el año 2011, se realizaron 23,480 lavados uterinos, de los que se obtuvieron 192,418 embriones, un 56,5% transferibles. El 93% del total de embriones de bovinos transferidos en ese periodo se obtuvieron por esta técnica (AETE, 2012).

2.4 ANATOMÍA REPRODUCTIVA DE LA VACA.

Los órganos que componen el sistema reproductor de la vaca son genitales externos, vagina, cérvix, cuernos uterinos, oviductos y ovarios (Figura 1).

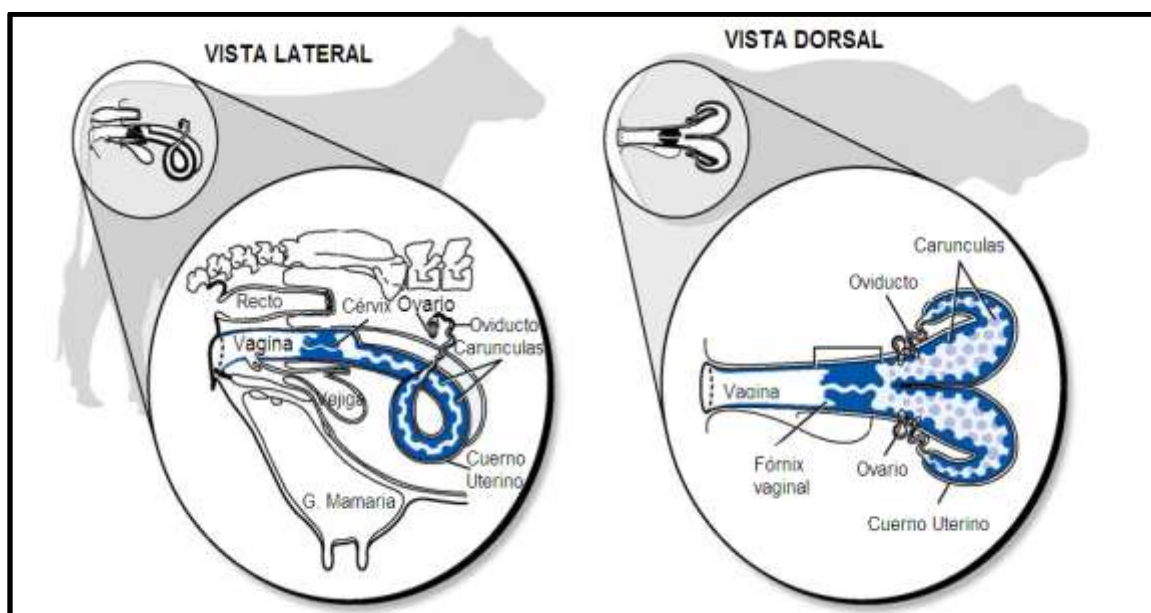


Figura 1. Anatomía reproductiva.

La vaca en gestación (UF/IFAS, 2016).

Las funciones de los ovarios son exocrinas (liberación del huevo) y endocrinas (esteroidogénesis), los oviductos dan paso a óvulos y espermatozoides así como capacitación, hiperactivación, fertilización y desarrollo temprano de la pre implantación, el útero se encarga del transporte de esperma del sitio de deposición al sitio de fertilización en el oviducto, el cuello uterino facilita el transporte del esperma por el moco cervical en la luz del útero y actúa como reservorio de esperma y la vagina es el órgano copulatorio en el cual se depositan los espermatozoides (Hafez y Hafez, 2000).

2.5 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA.

La función reproductiva está bajo el control del hipotálamo y la adenohipófisis, el hipotálamo tiene grupos de neuronas endócrinas denominados núcleos que secretan hormonas peptídicas para controlar la actividad de la hipófisis que responde sintetizando las hormonas. Una hormona es una sustancia fisiológica, orgánica y química sintetizada y secretada por una glándula endócrina.

La glándula hipofisaria se divide en tres partes: el lóbulo anterior denominado adenohipófisis o pars distalis, un lóbulo intermedio llamado pars intermedia y lóbulo posterior denominado neurohipófisis o pars nervosa (Bradley, 2014).

La adenohipófisis estimula la secreción de hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y prolactina. La FSH y LH actúan en sinergismo durante el desarrollo y ovulación de folículos ováricos, la FSH tiene mayor importancia durante el crecimiento folicular y LH predomina en estadios finales desde la maduración hasta la ovulación.

La oxitocina es liberada por la neurohipófisis, tiene importancia en el control de la reproducción, su síntesis al igual que GnRH y vasopresina, comprenden la producción de una molécula precursora mayor, con una región C-terminal denominada péptido asociado a GnRH (GAP).

Aunque el GAP puede estimular la liberación de FSH y LH, se piensa que la GnRH es esencial para liberación de gonadotropinas. El GAP es aún más importante en la inhibición de la secreción de prolactina (Hafez ESE y Hafez B. 2002., Bradley, 2014).

2.6 CICLO ESTRAL DE LA VACA.

En los ovarios y genitales de la vaca ocurren cambios morfológicos, endócrinos y secretores durante el ciclo estral, que resultan útiles en la sincronización, superovulación e inseminación artificial.

La vaca presenta miles de folículos en cada ovario pero solo uno de ellos experimenta ovulación durante el ciclo estral, las vacas experimentan dos cambios de actividad folicular la primera al inicio y la segunda a la mitad del ciclo, en la primera curva surge un pequeño folículo (5 mm) y se convierte en un folículo mayor (10 mm) entre los días 5 y 11; después experimenta atresia, aunque no sufre el proceso de ovulación segrega valores similares de estradiol con respecto al folículo ovulatorio. Hay grandes folículos productores de estrógenos desde la

segunda fase de actividad folicular, de esta manera un gran folículo se presenta en el ovario durante el ciclo estral y este controla el destino de los otros folículos.

Solo uno o dos folículos de gran tamaño que llegan a estar presentes poco antes de inicio del estro cumplen la fase de crecimiento y constituyen el folículo de Graaf, capaces de someterse al procesos de ovulación, este folículo de Graaf, brillante y repleto de líquido se expande sobre la superficie del ovario (Hafez y Hafez, 2000).

El sitio de ovulación está marcado por una pálida área vascular (estigma) y a partir de ella se libera tanto el óvulo como el contenido folicular, después el folículo colapsa de forma que cuando se efectúa la palpación rectal, el folículo se siente como un área suave, deprimida en la superficie del ovario. No hay hemorragia en este sitio porque el folículo se llena de sangre convirtiéndose en una estructura conocida como cuerpo hemorrágico (Lamb *et al.*, 2009).

La cavidad se llena poco a poco con células del cuerpo lúteo, el cual alcanza su madurez a los 7 días después de la ovulación desempeñando funciones durante 8 o 9 días y después involuciona, cambia de color durante el ciclo, al inicio es rojo ladrillo, cambia a amarillo a la mitad del ciclo y amarillo blanquecino al final de éste. Es así que los cuerpos lúteos viejos se observan en la superficie del ovario como cicatrices blanquecinas (cuerpo albicans) (Hafez y Hafez, 2000).

2.7 SINCRONIZACIÓN DE ESTRO.

La sincronización de estro es la coordinación de las hormonas reproductivas con el cuerpo lúteo (CL) y el desarrollo del folículo para producir un entorno hormonal optimizado en el que todos los animales ovulan dentro de un determinado periodo de tiempo y las hembras pueden quedar gestantes.

Un factor importante que limita el comportamiento reproductivo de las vacas lecheras lactantes es el fallo para detectar vacas en celo con precisión y ésta es la principal razón para el aumento en el intervalo entre partos en muchos hatos lecheros.

La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) facilita la programación precisa de la primera inseminación artificial posparto mejorando el rendimiento reproductivo durante el primer período post-parto, sin inversión mano de obra para la detección de celos. Varios programas de sincronización de estro permiten la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en vacas, la mayoría requieren varios días para ordenar vacas con el fin de administrar el tratamiento y es difícil reducir el intervalo entre el inicio del tratamiento y la inseminación artificial a menos de 9 días (Ümüt *et al.*, 2008).

Los protocolos de sincronización de celo y ovulación que regulan el desarrollo folicular y la regresión lútea con GnRH y PGF2 α inyectada al día 7 han recibido una amplia aceptación en los programas de manejo reproductivo de carne y ganado lechero. La secuencia de inyecciones con GnRH (día 0), PGF2 α (día 7) y GnRH (día 9) se llama programa Ovsynch porque sincroniza la ovulación y permite una inseminación a tiempo fijo (Ümüt *et al.*, 2007).

2.7.1 OPCIONES DE SINCRONIZACIÓN DE ESTRO.

La sincronización ideal del estro resulta en la aparición de celo independiente del estado reproductivo o etapa del ciclo estral al inicio del tratamiento.

Tanto el manejo de los animales y el costo deben ser mínimos, sin embargo después del tratamiento de sincronización se pueden producir variaciones en el inicio del estro, las cuales dependen de la sincronización en la regresión del cuerpo lúteo, la etapa del crecimiento folicular y la duración del folículo dominante, por lo tanto, éstas determinan si puede utilizar la inseminación a tiempo fijo (IATF). Un folículo dominante desarrollado recientemente debe estar presente al final del tratamiento con la finalidad de optimizar la gestación (Lane *et al.*, 2008).

Los tratamientos para sincronización de estro son los siguientes:

- Progesterona en combinación con un agente luteolítico y o un agente para regular las ondas del folículo; por ejemplo estradiol utilizado en el inicio del tratamiento y progesterona para regular el desarrollo del folículo ovulatorio.

- Compuestos como el estradiol o GnRH durante el pro-estro para sincronizar la oleada de gonadotropina y disminuir aún más la variación en la aparición del celo y la ovulación.
- Con agentes luteolíticos como la PGF2 α sola o con un agente para regular el desarrollo folicular del ovario. La prostaglandina es una hormona luteolítica que regula la vida útil del cuerpo lúteo (CL). Una limitación, es que los animales sólo responderán si tienen un cuerpo lúteo funcional presente en el momento del tratamiento y por lo tanto no es adecuado para su uso en novillas prepúberes y vacas en el periodo postparto temprano (Lane *et al.*, 2008).

2.7.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ESTRO.

La detección de estro es un arte, y clave en la rentabilidad de las vacas, pero la detección es cada vez más difícil debido a la disminución de la expresión asociado con aumentos en la producción de leche, las vacas son reportadas por mostrar un estro de menor duración y con menor intensidad.

Existe una gran variedad de herramientas algunas son beneficiosas como complemento de un programa bien organizado de detección visual (Figura 2).



Figura 2. Detección visual de estro.

La vaca que está en estro se deja montar por otras vacas (Acevedo, 2015).

Aunque las herramientas, arriba mencionadas, no deben ser consideradas como sustitutos de la observación sino como una solución a los problemas de detección de estro y deben asegurar:

1. Continúo seguimiento del animal.
2. Automática y exacta identificación del animal en celo.
3. Funcionar durante la vida productiva de la vaca.
4. Minimizar los requerimientos de mano de obra.
5. Exactitud de identificar el evento fisiológico (Veerkamp and Beeda, 2007).

Detector de monta.

Incluyen los parches detectores adheribles a la grupa y la pintura en la cola, la porcentaje de erros es de 30% si no se utiliza con una buena observación e información de estros anteriores.

Planilla de detección de estros.

Calendario de 21 días útil en la predicción del día en que se espera se produzca en próximo estro, permite identificar problemas en la detección estros en la unidad de producción ya que puede estimar el porcentaje de estros detectados.

Animales detectores.

Vacas, vaquillas o novillos tratados con testosterona o estrógeno para inducir el aumento de la actividad de monta ya que muestran una actividad sexual incrementada y son sexualmente activos.

Test de progesterona en leche.

Determina la exactitud de detección de celo e identifica vacas problema. La progesterona es baja en día del estro por lo cual la colecta de muestras de vacas identificadas en celo puede ser utilizada para su verificación.

Podómetros.

La eficiencia varía de un 60 a 100%, van adosados a uno de miembros posteriores de la vaca. El número de pasos por hora de las vacas es alrededor de 2 a 4 veces más que las que están en diestro. La podometría ha sido incorporada en sistemas

de manejo de rodeos y utilizada como éxito como único método de detección de estro (Becaluba y Becaluba, 2006).

2.8 SUPEROVULACIÓN.

La superovulación es una técnica utilizada para recolección de ovocitos/embriones *in vivo*, la demostración de que la gonadotropina sérica de yegua preñada (por sus siglas en inglés, PMSG) induce la ovulación múltiple, estableció las bases de la superovulación.

La PMSG es una hormona presente en la sangre de la yegua entre los días 40 y 130 de la gestación además posee actividad biológica de FSH y LH, posteriormente se utilizó FSH de pituitaria porcina (FSH-p), la cual demostró tener una respuesta mayor y más consistente en la superovulación que la PMSG (Gordon, 1994).

La superovulación se hace de 3 a 4 veces por vaca/año, si se estimula continuamente se puede causar desde una sobreestimulación de los ovarios hasta la formación de quistes foliculares o fibrosis ovárica. La dosis óptima de FSH-p a utilizar varía entre 18 y 40 mg, las dosis totales se dividen en 2 aplicaciones diarias por 4 días o sea 8 aplicaciones.

También se puede hacer una sola aplicación de la dosis total de FSH-p en la escápula, particularmente con ganado para producción de carne o cebú, los cuales son muy susceptibles al estrés (Mapletoft *et al.*, 1988). Por ejemplo un tratamiento de superovulación con duración de 4 días y una dosis total de 32mg de FSH (Cuadro 2).

Cuadro 2. Ejemplo de un tratamiento de superovulación.
En vacas para producción de embriones (Lewis, 1990).

Día	Evento	Vía
0	Estro (Día 9)	
10	FSH 5mg	SC 2 veces al día.
11	FSH 4mg	SC 2 veces al día.

12	FSH 4mg PGF2 α 25mg	SC 2 veces al día. IM 2 veces al día.
13	FSH 3mg	SC 2 veces al día.
14	Celo am IA pm	Doble dosis de semen para asegurar la fertilización de todos los óvulos liberados.
15	IA am	

Aunque existen diferentes preparaciones de FSH y técnicas de inyección para superovular, las concentraciones óptimas en sangre de FSH para inducir respuestas superovulatorias eficaces actualmente no se conocen (Kelly *et al.*, 1997).

Los protocolos de superovulación han evolucionado mucho en los últimos 40 a 50 años, el objetivo de los tratamientos para inducir superovulación en programas de transferencia de embriones es obtener el máximo número de embriones transferibles con una alta probabilidad de gestaciones viables (Bó and Reuben 2014).

Tradicionalmente, los protocolos de superovulación tienen limitaciones como: 1) la necesidad de detectar un calor para establecer un “estro base” para el desarrollo del protocolo, 2) incapacidad para comenzar el tratamiento superovulatorio en el tiempo óptimo para el desarrollo de la onda folicular, 3) necesidad de un detector de estro para determinar el tiempo de la inseminación artificial y 4) entre el 20-30% de las donadoras no responden al tratamiento superovulatorio y por ende, no hay producción de embriones (Garzon *et al.*, 2007).

2.9 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.

La inseminación artificial comprende la colección, evaluación y posterior introducción del semen dentro del tracto reproductivo de la hembra. Es una eficaz e importante técnica para el mejoramiento genético de los rebaños, aumenta el número de crías con descendencia de un solo macho y transferencia de genes

deseables entre poblaciones, antes del desarrollo de los procesos de crioconservación y descongelación para almacenamiento de semen la inseminación artificial (IA) se realizaba con muestras de semen fresco y refrigerado (Durrant, 2009).

Con el descubrimiento de agentes crioprotectores y avances en la producción de materiales de laboratorio, el uso de semen de bovino fresco o refrigerado fue abandonado gradualmente. El semen crioconservado rinde tasas de fecundidad más bajas en comparación con semen fresco, con similar número de espermatozoides móviles, esta reducción en la fertilidad se atribuye a cambios en la temperatura durante el proceso de congelación, así como el estrés osmótico y tóxico, debido a la exposición al crioprotector y a la formación de cristales de hielo. La principal ventaja del semen refrigerado es que evita daños asociados con la congelación, asegurando así mayor viabilidad y permitiendo la reducción de concentraciones de espermatozoides por dosis y el uso de animales genéticamente superiores (Papa *et al.*, 2015).

2.10. LAVADO DE EMBRIONES.

Los embriones se extraen de forma no quirúrgica del útero después de la compactación, blastulación, durante la expansión preferentemente el 7° día después de la inseminación mediante lavado uterino transcervical, lo cual se ha establecido en todo el mundo para estandarizar su valoración y manipulación para su comercialización. En el día 7° los embriones son más fáciles de obtener y separar ya que se ubican en el extremo anterior del cuerno uterino y mediante el lavado son fácilmente arrastrados al exterior flotando en el medio, se encuentran en fase de blastocisto o mórula, fases muy estables, lo que hace posible que sean transferidos directamente o que sean sometidos a micro manipulación y/o vitrificación. Las fases de desarrollo en el período embrionario temprano se ilustran continuación en la (Figura 3).

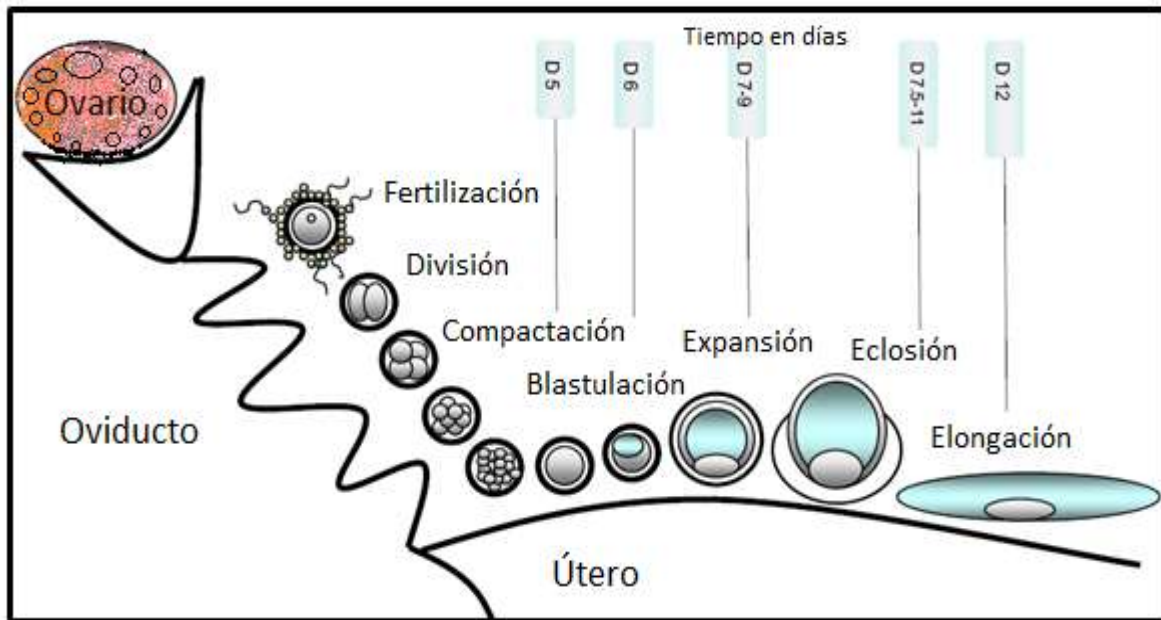


Figura 3. Desarrollo embrionario.

Inicia en el oviducto donde se lleva a cabo la fertilización hasta el día 6 que ocurre la blastulación y posteriormente sigue el desarrollo en útero (Peippo *et al.*, 2011).

La recogida de embriones se realiza a través de la vagina, bajo control rectal con una duración de 15 a 20 minutos. Para el lavado se utiliza una sonda flexible con balón inflable que se introduce con un mandril o fiador para hacerla rígida, a través de la vagina, cérvix y cuerpo uterino hasta uno de los cuernos. Con el extremo de la sonda en la curvatura mayor del cuerno uterino se retira el mandril o fiador de 8 a 10 cm, avanzando con cuidado la sonda en dirección craneal, se infla el balón con 10 a 20 ml de aire y se retira el mandril cuando el balón se encuentra más o menos 5 cm craneal a la bifurcación uterina, a la altura del ligamento intercornual (Görlach, 1997).

El lavado se hace con el medio en fracciones de 30 a 50 ml que fluyen, tras retirar la jeringuilla de la sonda. Con el medio lavado fluyendo es conveniente mover y masajear el cuerno uterino así los embriones localizados en criptas o pliegues son

arrastrados por la corriente del medio hacia el exterior. Al finalizar el lavado de uno de los cuernos se infunde de nuevo de 20 a 50 ml de medio levantándose el extremo craneal del cuerno para posibilitar el reflujo del último resto del líquido acumulado. En total se estima necesario un litro de medio de lavado para ambos cuernos, aunque 250 ml por cuerno en vacas y en 180 ml novillas son suficientes. El medio resultante de la recogida se mantiene a temperatura ambiente hasta el aislamiento de los embriones, debiéndose evitar oscilaciones de temperatura. Las tasas de recuperación de embriones mejoran cuando la sonda de lavado se coloca inmediatamente anterior a la bifurcación uterina en lugar de la punta del cuerno uterino (Peippo *et al.*, 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

Las técnicas de asistencia reproductiva datan de hace más de 50 años. Entre estos se encuentran la inseminación artificial, la sincronización de estro, la superovulación, la transferencia de embriones y la clonación. En México las técnicas de uso común son las 4 primeras sin embargo no existe información en español, ajustada a la disponibilidad de insumos farmacéuticos y tecnológicos que permitan que un Médico Veterinario Zootecnista tenga la facilidad de implementar estas técnicas de manera fácil y ordenada. De ahí que exista la necesidad de contar con bibliografía ajustada a las necesidades y recursos disponibles en el país.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Seleccionar información para que el lector conozca las biotecnologías implicadas en la producción *in vivo* de embriones bovinos.

ESPECÍFICO

Describir el método y material que involucra la producción *in vivo* de embriones bovinos.

V. MÉTODO

Existen diversos esquemas para la producción de embriones en bovinos de acuerdo a las características del animal y su entorno (Bolívar y Maldonado, 2008). Dentro de ellos se tiene la producción *in vivo* e *in vitro*; ambas tienen el objetivo de maximizar la descendencia de una hembra donadora, con características productivas y reproductivas que requieran los sistemas de producción ganadera (Herradón *et al.*, 2007).

La producción *in vivo* de embriones bovinos consiste en seleccionar la hembra donadora para aplicar un tratamiento hormonal e inducir la ovulación múltiple, realizar la inseminación artificial y recolectar los embriones (Seidel y Seidel, 1991).

A. SELECCIÓN DE LA DONADORA.

Los criterios de selección son diversos y actualmente son más influenciados por aspectos económicos. Hasta hace 25 a 30 años, la producción de embriones solo se realizaba en animales sumamente valiosos, y en medida en que el valor genético y económico aumentan los costos asociados tienden a reducirse (Mapletof, 1986).

Las técnicas no quirúrgicas de recolección y transferencia, así como el incremento en las tasas de preñez con embriones congelados, han contribuido a la reducción de los costos (Hasler, 2013). Bajo estas circunstancias, el 10% de vacas élite de un rebaño de ganado puro podrían ser usadas como donadoras, para luego servirles y hacerlas concebir normalmente, para mantener los intervalos entre partos cercanos a un año, mientras que el otro 90% de las vacas del rebaño podrían servir como receptoras.

Aunque la poca promoción ha tendido a influenciar el valor genético real, la habilidad para transmitir características deseables, debe ser la consideración más importante a largo plazo. La selección debe basarse en tres criterios: superioridad genética, capacidad reproductiva y valor comercial de la progenie (Mapletof, 1985).

Al seleccionar donadoras de razas de carne con genética superior, se deben considerar características objetivas como la facilidad de parto, producción de leche, peso al destete y al año y valor de la canal. Ya que los toros de carne pueden ser evaluados ahora con mucha precisión en cuanto a su mérito genético, también es extremadamente importante la selección del toro con el que se inseminará la donadora. (Carbalo *et al.*, 2010).

Los criterios para la selección de vacas de leche como donadoras están actualmente muy bien establecidos. Como los buenos resultados también contribuyen en la reducción de los costos, la selección de las donadoras incluye la historia previa del éxito obtenido en anteriores transferencias. Además, las hijas de vacas que han sido usadas con éxito en transferencia de embriones, muy posiblemente serán también buenas donadoras. Se ha sugerido que la donadora potencial debe ser un animal en su mejor edad reproductiva (vaquilla y vaca de hasta 3 partos), tener historia de un alto nivel de fertilidad y haber demostrado superioridad en características de importancia económica. El manejo de criterios de selección estrictos asegurará la superioridad genética y un alto nivel de éxito, haciendo que el procedimiento sea más económico (Keller and Teepker, 1990).

Las vacas donadoras deben tener como mínimo 50 días posparto, estar ciclando normalmente, y estar en un plano de nutrición adecuado, sin tener deficiencias nutricionales específicas (Tríbulo *et al.*, 2012).

Se recomienda el uso de minerales traza como suplementos antes de la superovulación, y aunque aparentemente no hay datos que lo soporten más allá de las impresiones clínicas, el uso de minerales traza es recomendable para mejorar la respuesta superovulatoria y la producción de embriones porque funcionan como activadores de sistemas enzimáticos (Church *et al.*, 2012).

Es fundamental que no haya historia o evidencia física de infertilidad. Es importante resaltar que las vacas (o hijas de vacas) con historia de superovulaciones exitosas o de partos gemelares, tienen mayores posibilidades de responder bien al tratamiento (Colazo y Mapletof, 2007).

B. SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACIÓN.

El día de inicio del tratamiento se designa como día 0; ese mismo día se realiza palpación rectal para descartar alteraciones reproductivas y se evalúan estructuras ováricas para determinar el estado de ciclicidad de las vacas (Figura 4).

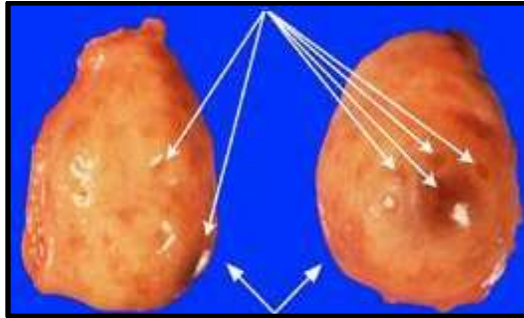


Figura 4. Ovarios con folículos.

Los folículos son estructuras con forma de ampolla y rellenas de fluido, que contienen los oocitos u óvulos en desarrollo (selectsires.com, 2015)

Después de la evaluación mediante palpación rectal a las vacas que se determinan ciclando se les aplica el programa Ovsynch (Figura 5).

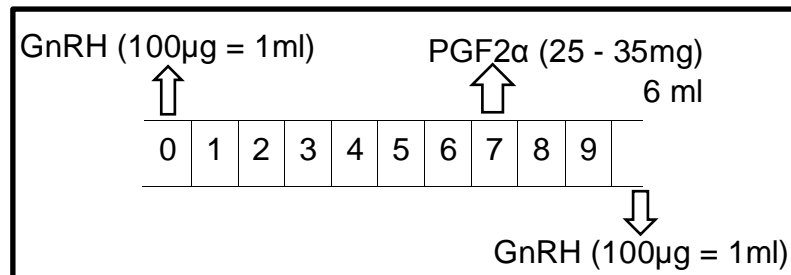


Figura 5. Ovsynch

En el protocolo de sincronización de la ovulación, la primera inyección de GnRH provoca una descarga de la hormona de LH la cual induce la ovulación del folículo dominante presente en el ovario y origina una nueva onda de crecimiento folicular dos a tres días más tarde. La PGF2α aplicada el día siete tiene un efecto luteolítico y GnRH el día nueve, sincroniza la ovulación. (Pursley et al, 1995).

La técnica como se aplican todas las hormonas es intramuscular clavando la aguja con jeringa estériles de un sólo golpe, verticalmente sobre los músculos de la vaca en la región del anca.

C. SUPEROVULACIÓN.

La hormona foliculo estimulante (FSH) comercial que se distribuye en México se conoce como **PLUSET**, la cual marca el protocolo que se ilustra en el (Cuadro 3).

Cuadro 3. Superovulación con Pluset®.

Reg. SAGARPA: Q-7965-082, Laboratorios CALIER, S.A. Presentación: Caja que contiene 1 frasco de liofilizado de Pluset con 500 UI de FSH y 500 UI de LH, más un frasco de 20ml de solución fisiológica estéril, apirógena e inyectable. A partir del día 10 de haber aplicado el programa Ovsynch. Las fechas fueron puestas como dato ilustrativo.

Días	Fecha	Evento	Dosis	Hora
Día 10	16/06/2015	FSH am pm (150 UI)	3 ml	7:00 am pm
Día 11	17/06/2015	FSH am pm (125 UI)	2.5 ml	7:00 am pm
Día 12	18/06/2015	FSH am pm (100 UI)+ PGF2α pm	2 ml y 7 ml	7:00 am pm
Día 13	19/06/2015	FSH am pm (75 UI)	1.5 ml	7:00 am pm
Día 14	20/06/2015	FSH am pm (50 UI)	1 ml	7:00 am pm
Día 15	21/06/2015	Inseminación Artificial, am y pm con doble dosis.		
Día 21		Lavado de Embriones		

Otro protocolo se realiza con FOLLTROPIN -V BIONICHE (Cuadro 4), según las indicaciones del fabricante:

Cuadro 4. Superovulación con Folltropin®.

Laboratorios BIONICHE Belleville, Ontario Canadá K8N 5J2, ANIMAL HEALTH CANADA INC. Presentación: Caja que contiene 1 frasco de liofilizado de 20 ml, contiene el equivalente a 400 mg de NIH-FSH-P1 y otro frasco de diluyente de 20 ml de solución acuosa bacteriostática de cloruro de sodio USP para inyección. A partir del día 10 de haber aplicado el programa Ovsynch. Las fechas fueron puestas como dato ilustrativo.

Días	Fecha	Evento	Dosis	Hora
10	13/08/15	FSH (50mg) am pm	2.5 ml am y pm	7 am y pm
11	14/08/15	FSH (50mg) am pm	2.5 ml am y pm	7 am y pm

12	15/08/15	FSH (50mg) am pm	2.5 ml am y pm	7 am y pm
12	15/08/15	PGF2α 35 mg pm solamente	35 mg 7 ml pm	7 am y pm
13	16/08/15	FSH (50mg) am pm	2.5 ml am y pm	7 am y pm
14	17/08/15	IA am y pm con doble dosis de semen.		
22	25/08/15	Lavado de embriones		

D. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Las vacas donadoras se inseminan 2 veces con intervalo de 12 horas, empleando doble dosis de semen en cada inseminación para asegurar la fertilización de todos los óvulos liberados. El semen se mantiene a -196°C (-320°F) en un termo con nitrógeno líquido (NL_2), con más de 10 cm de nitrógeno, si tiene menos el semen se descongela y se pierde (Figura 6).

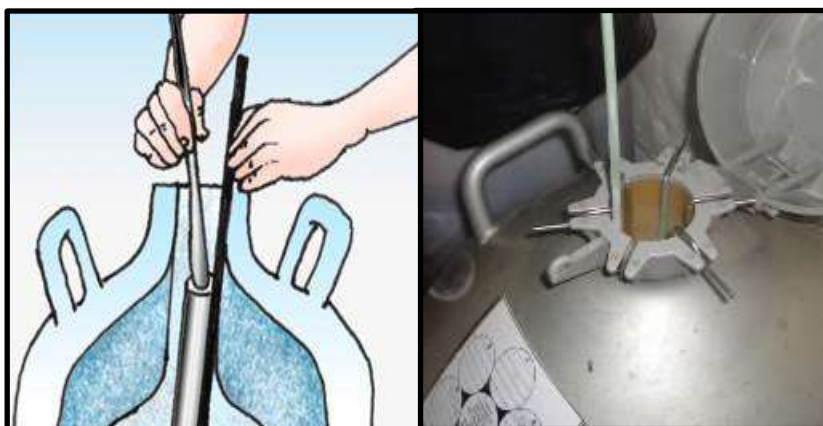


Figura 6. Termo criogénico.

Al momento de sacar la dosis, la canastilla no debe pasar del cuello, para evitar cambios de temperatura que repercutan en la calidad seminal (Palma, 2008 y Acevedo, 2015).

La extracción de la pajilla (0.5 cm) del termo se realiza con pinzas e inmediatamente se descongela llevándola a un termo con agua a una temperatura entre 35 - 37°C de 30 a 40 segundos, midiendo la temperatura con un termómetro de laboratorio (Figura 7).

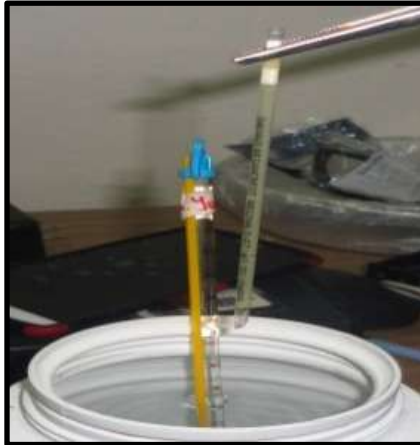


Figura 7. Pajilla de semen.

Se descongela en termo con agua a una temperatura de entre 35 – 37°C (Acevedo, 2015).

Mientras la pajilla se descongela es momento de preparar la pistola de inseminación de 0.5 cm., atemperándola mediante fricción en una toalla papel o usar aplicadores pegados al cuerpo, porque al frotarla podemos elevar la temperatura y dañar el semen (Figura 8).



Figura 8. Pistola de inseminación artificial.

Se atempera en un aplicador que va colgado al cuerpo o si no se cuenta con el aplicador se frota con una toalla de papel (Alta Genetics, 2013).

Posteriormente la pajilla se extrae del agua y se seca con una toalla de papel (Figura 9).



Figura 9. Pajilla con toalla de papel.

Cuidar su integridad es básico porque las gotas de agua pueden matar los espermatozoides (Acevedo, 2015).

Ya seca la pajilla se realiza el corte recto por debajo del extremo sellado con alcohol polivinílico, manipulándola con papel sin exponerla a la luz solar, al viento, etc., para evitar un shock térmico (Figura 10).

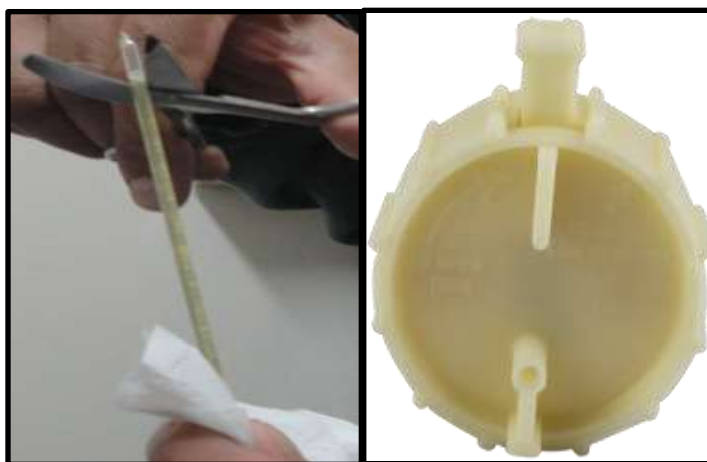


Figura 10. Corte de la pajilla.

Con tijeras o para que el corte sea exacto se usa cortapajillas (Acevedo, 2015).

En la pistola de inseminación con el embolo hacia atrás 15 a 20 cm se coloca la pajilla descongelaada y con el corte hacia arriba (Figura 11).

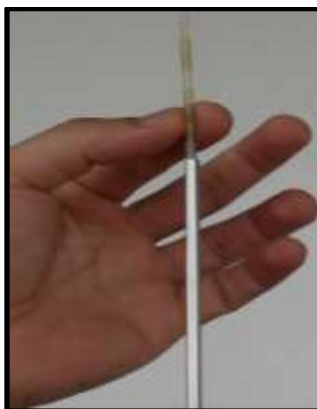


Figura 11. Pajilla descongelaada.

Se coloca dentro de la pistola de inseminación que previamente fue atemperada y el embolo esta retraído de 15 a 20 cm abajo (Acevedo, 2015).

Finalmente se coloca la funda desechable y la camisa sanitaria que protegen la pistola de inseminación con la pajilla de semen durante su paso por la vagina hasta pasar el cérvix para mantenerla protegida de contaminación y se lleva en el aplicador o bajo el overol hasta el sitio donde se encuentra la vaca (Figura 12).

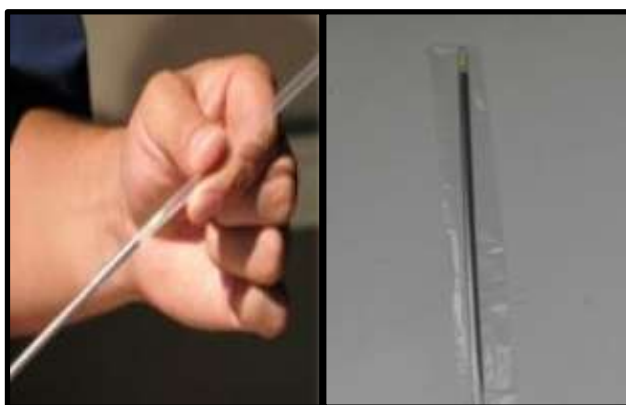


Figura 12. Funda desechable y camisa sanitaria.

Protegen la pistola de inseminación con la pajilla dentro ya lista para ir a inseminar la vaca (Acevedo, 2015).

Ya con la vaca identificada se realiza la limpieza externa de la vulva (Figura 13).



Figura 13. Limpieza externa de la vulva.

Para retirar el exceso de estiércol con agua en caso de que este muy sucia, posteriormente secar con una toalla de papel, sin ejercer mucha presión al limpiar, pues se puede empujar estiércol hacia adentro de la vulva y la vagina (Acevedo, 2015).

Usar la mano izquierda para manipular el aparato reproductor y la mano derecha para manipular la pistola de inseminación artificial. Debido a que el rumen está ubicado al lado izquierdo de la cavidad abdominal y empuja ligeramente al aparato reproductor hacia la derecha (Figura 14).



Figura 14. Introducir la pistola de inseminación.

Con la mano izquierda enguantada dentro del recto y en forma de puño hacer presión vertical sobre la vulva para abrir los labios de la vulva lo más que se pueda (Acevedo, 2015).

La pistola se inserta en ángulo de 45° hasta tocar el techo de la vagina, en este punto se nivela y se lleva muy suavemente al fondo de la vagina (Figura 15).



Figura 15. Técnica de inserción.

Para evitar introducir la pistola de inseminación en el orificio uretral o en los sacos que se forman en la vagina con los pliegues internos (Alta Genetics, 2013).

Dentro de la vagina existen pliegues que se evitan empujando el cérvix hacia adelante para alargar las paredes de la vagina y colocar la pistola al centro en la entrada del cérvix (Figura 16).



Figura 16. Pistola de inseminación en la entrada al cérvix.

Es en este momento donde se identifica el cérvix, para posteriormente introducirla a través del cérvix (Alta Genetics, 2013).

La pistola de inseminación pasa suavemente los anillos cervicales, por eso puede darse cuenta cuando se va avanzando, no forzando la pistola y manteniendo la flexibilidad (Figura 17).

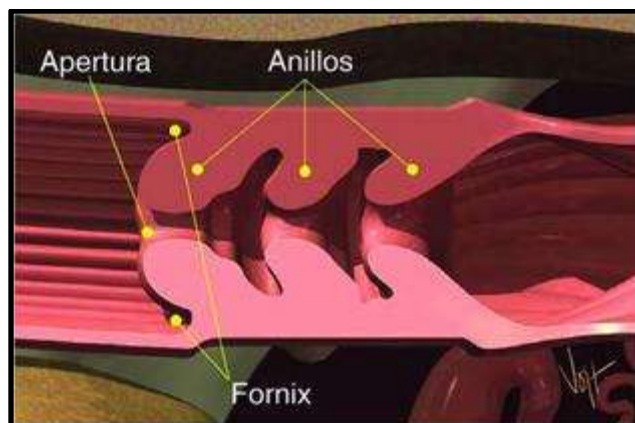


Figura 17. Anillos cervicales.

El cérvix consiste principalmente de tejido conectivo denso y es la referencia para inseminar, son 3 - 4 anillos que al momento de pasarlos se sienten. (selectsires.com, 2015).

En el momento de pasar los anillos cervicales y estar seguros del sitio donde dejaremos el semen, se extrae la camisa sanitaria (Figura 18).



Figura 18. Extracción de la camisa sanitaria.

Para realizar el depósito del semen se extrae la camisa sanitaria que cubre la pistola de inseminación (Rodríguez, 2012).

Pasando el último anillo cervical, ya se puede depositar el semen. Una forma de saber que ya estamos en el cuerpo del útero, es sintiendo con la mano la punta de la pistola de inseminación inmediatamente después del cérvix (Figura 19).

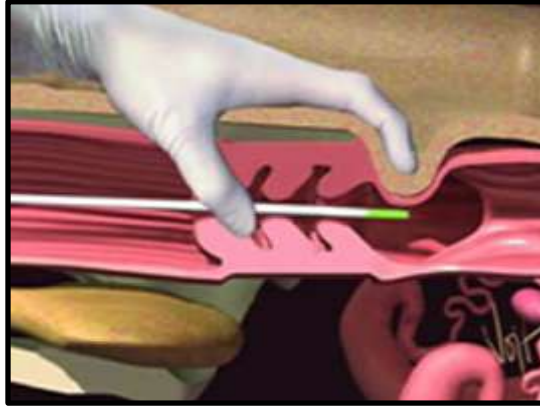


Figura 19. Inyección de semen.

La inyección de semen en el cuerpo del útero se realiza en tres tiempos mínimos de 20 a 30 segundos (selectsires.com, 2015).

Al terminar la inyección, esperar un mínimo de 30 segundos para retirar la pistola y finalmente aplicar un masaje en el clítoris de la vaca (Fernández y de la Barrera, 2009).

E. LAVADO DE EMBRIONES.

La colecta se realiza 7 días después de la última inseminación, de forma no quirúrgica, mediante lavado uterino transcervical (Peippo, *et al.*, 2011). Con aplicación de anestesia epidural con lidocaína al 2%, 5 ml en el espacio comprendido entre la primera y segunda vértebra coccígea, previo rasurado y limpieza de la región (Figura 20).

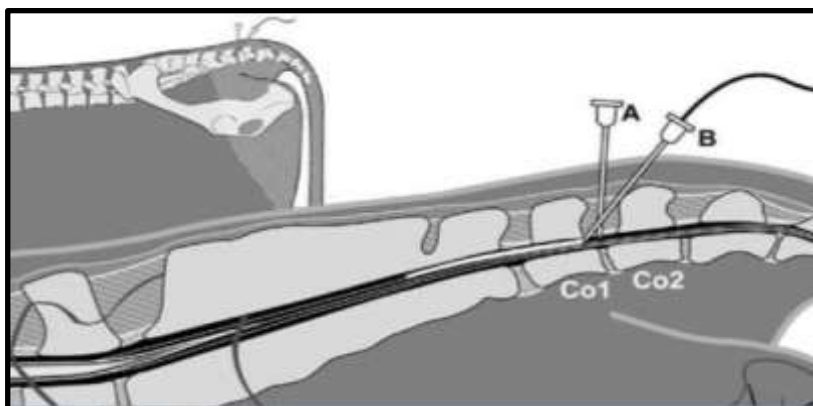


Figura 20. Aplicación de lidocaína.

Para tener mejor control de la región anal, perineal, vulvar y vaginal (Muir *et al*, 2008).

Preparación de la vaca, vaciado del recto, limpieza de zona perineal (Figura 21).



Figura 21. Palpación rectal.

Del lado izquierdo para detección de la posición y dimensión del útero. Del lado derecho: para la detección del número de cuerpos lúteos presentes, para tener una idea general del número de embriones que se pueden obtener (De la Fuente, 2012).

Lavado de la zona perineal para evitar contaminación, con agua común realizar varios lavados hasta que no haya estiércol pegado y finalmente secar con toalla de papel (Figura 22).



Figura 22. Limpieza de la región perineal.

Por el exceso de estiércol que se llega a acumular es necesario realizar lavado con agua, las veces que sea necesario para evitar que la sonda Foley introduzca estiércol a la vagina o que la manguera se ensucie de estiércol (Acevedo, 2015. Google.com, 2016).

La sonda flexible tipo FOLEY, 2 VÍAS, 16 A 20 FR., GLOBO 5 O 30 CC, BARDIA (Figura 23).



Figura 23. Sonda tipo Foley.

El calibre de la sonda Foley dependerá de la talla y la edad de la donadora, 14 para vaquillas, 16 para vacas y 18 o 20 para vacas muy grandes (Pro Cows, 2015).

La sonda tipo Foley se introduce manipulando el recto a través de la vagina, cérvix y cuerpo uterino hasta uno de los cuernos (figura 24).



Figura 24. Introducción de la Sonda tipo Foley.

Tiene dos vías de entrada, una para aire y la otra para líquidos. El catéter se introduce en el útero (en un cuerno) (Pro Cows, 2015).

Para mantener fija la sonda Foley dentro del cérvix se aplica aire (25 ml) hasta sentir turgente el globo de la sonda Foley (Figura 25).

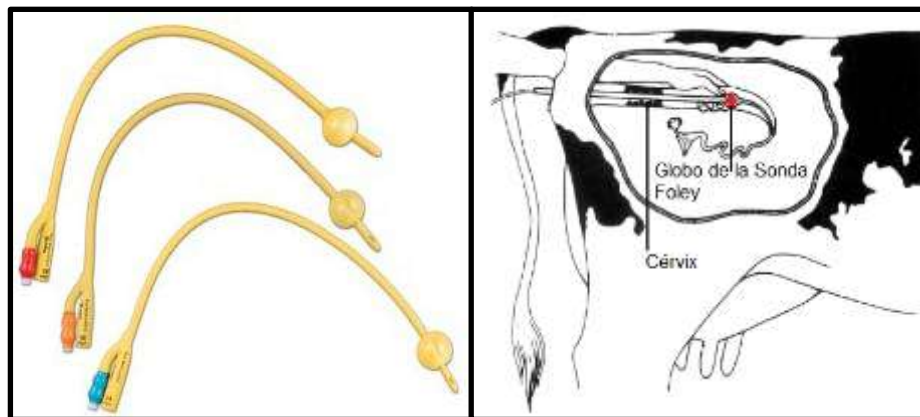


Figura 25. El globo de la Sonda tipo Foley.

Se infla bloqueando la salida del cuerno para que los embriones no se escapen durante el lavado. Por palpación rectal se asegura la localización del catéter (Pro Cows, 2015).

La sonda Foley, 2 vías, 16 A 20 Fr., globo 5 O 30 cc, Bardia se conecta a la manguera tipo Tygon larga 152 cm, irradiada, Mca Agtech (Figura 26).



Figura 26. Conexión de la Sonda tipo Foley con la manguera Tygon.

Para pasar el medio lavado a uno de los cuernos uterinos y posteriormente mediante un masaje hacer que el medio fluya hacia el exterior (Pro Cows, 2015).

De la manguera se conecta el medio de lavado ViGRO Complete Flush, Bioniche Animal Health USA. Inc (Figura 27).



Figura 27. Conexión de la manguera Tygon.

Se conecta la manguera al medio de lavado ViGRO para que fluya al cuerno uterino y realizando masajes vía rectal (Pro Cows, 2015).

Con 250 a 500 ml de medio de recolección se lava cada cuerno uterino, realizando masajes del cuerno uterino para que los embriones localizados en criptas o pliegues sean arrastrados por la corriente del medio hacia el exterior (Figura 28).



Figura 28. Medio de recolección ViGRO.

Fluye hacia el cuerno uterino y de este al filtro de recolección (ergomix.com, 2011).

El medio resultante se mantiene en el filtro de recolección hasta el aislamiento de los embriones evitando oscilaciones de temperatura (Figura 29).



Figura 29. Filtro de recolección de embriones.

Para llevarlos al laboratorio y buscarlos mediante microscopio estereoscópico (Rivera, 2013).

F. MANIPULACIÓN DE EMBRIONES

La búsqueda de los embriones se realiza con microscopio estereoscópico en un aumento de 10X después de pasar el medio de recolección por un filtro con poros de aproximadamente 50 - 70 μm de diámetro. Son transferidos tan pronto como es posible después de ser recolectados, manteniéndolos a temperatura ambiente en el medio de mantenimiento. Los medios deben contener un amortiguador para mantener el pH entre 7.2 y 7.6 y osmolaridad de 300 mOs (Mapletof, 1986).



G. CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES



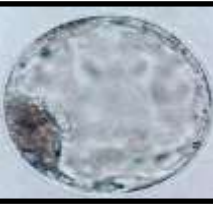

Es importante ser capaz de reconocer las diferentes etapas de desarrollo y su comparación con la etapa de desarrollo que el embrión debe tener el día 7 del ciclo estral en que las donantes son sometidas a lavado intrauterino. La decisión de si un embrión es digno de transferencia o congelación y si el embrión es elegible para la exportación se basará en la experiencia y conocimientos de la persona que evalúa el embrión (Bó and Mapletof, 2013).

H. ESTADOS DE DESARROLLO DEL EMBRIÓN

Una vez se ha producido la fecundación, se presenta un proceso de división mitótica del cigoto, dando lugar a los denominados períodos de crecimiento y desarrollo embrionario que corresponden a etapas diferentes de desarrollo del embrión, las etapas deseables en la producción de embriones y que son las recomendadas para transferir en fresco o someter a procesos de vitrificación son mórulas compactas o blastocitos tempranos, durante la búsqueda de embriones se puede encontrar en diferentes etapas de desarrollo como lo ilustra el Cuadro 5.

Cuadro 5. Estados de desarrollo del embrión (García y Gil, 2012).

Etapas de Desarrollo	Descripción
<p>Mórula Temprana</p> 	<p>El embrión tiene aproximadamente 5 días, los blastómeros individuales son difíciles de distinguir uno de otro. La masa celular del embrión ocupa la mayoría del espacio.</p>
<p>Mórula Compacta</p> 	<p>Los blastómeros se juntan y forman una masa celular sólida y compacta, embrión ocupa aproximadamente un 60% - 70% del espacio perivitelino.</p>

<p>Blastocito Temprano</p>	<p>Es una cavidad con fluido ó blastocele (1) y tiene apariencia general de anillo, el embrión ocupa el 70 - 80% del espacio perivitelino. Al inicio el embrión puede tener una apariencia de calidad cuestionable.</p>
	
<p>Blastocito</p>	<p>Se ven evidentes cambios de diferenciación de la capa externa o trofoblasto y la masa celular interna más oscura y compacta. El blastocele es más prominente y el embrión ocupa casi todo el espacio perivitelino. En este estado es posible diferenciar visualmente el trofoblasto y la masa celular interna.</p>
	
<p>Blastocito Expandido</p>	<p>El diámetro general de embrión se incrementa drásticamente, mientras que la zona pelúcida se adelgaza aproximadamente hasta un tercio de su grosor original.</p>
	
<p>Blastocito Eclosionado</p>	<p>Los embriones recolectados en este estado de desarrollo pueden haber iniciado su proceso de eclosión o pueden haber perdido completamente la zona pelúcida. Pueden ser esféricos con el blastocele bien definido o estar colapsados.</p>
	

I. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA



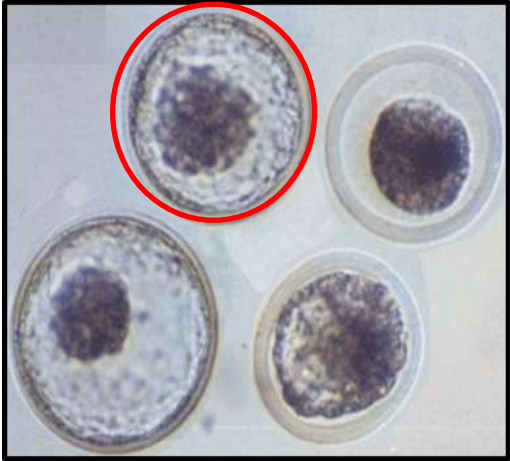
Para realizar la transferencia en fresco o someter embriones a procesos de criopreservación es preciso tener embriones de calidad excelente, ver Cuadro 6. La probabilidad de gestación depende del estadio en que se encuentra el embrión en el momento de la recolección.

La transferencia de mórulas tempranas alcanzó una tasa de preñez inferior ($p < 0.05$) frente a otros estadios más desarrollados (**Ver Anexo G**, Schneider *et al.*, 1980). Incluso se observó una tendencia creciente en la tasa de gestación a medida que avanza el desarrollo del embrión.

Una posible explicación para ello sería que las mórulas tempranas se encontraron retardadas en su desarrollo de acuerdo al momento de la recolección al 6°. 8° días de la recolección (Elsden *et al.*, 1978; Hasler *et al.*, 1987). Una segunda explicación es que los defectos morfológicos son más fáciles de observar en estadios embrionarios avanzados (Halley *et al.*, 1979).

Cuadro 6. Calidad embrionaria para transferencia o criopreservación (García y Gil, 2012).

Calidad	Descripción
<p data-bbox="431 1310 573 1339">Excelente</p> 	<p data-bbox="784 1371 1422 1734">Es considerado un embrión ideal, esférico, simétrico y con células de tamaño, color y apariencia uniformes. Se observan tres mórulas compactas de una excelente calidad, listas para ser transferidas a vacas receptoras, evaluadas y sincronizadas previamente.</p>

<p style="text-align: center;">Buena</p> 	<p>Hay blastómeros extruidos, de forma irregular y vesículas. Embriones de vaca donadora superovulada recolectados 7 días después de la inseminación, de izquierda a derecha mórula compacta transferible, dos óvulos no fertilizados dos embriones y otro ovulo no fertilizado</p>
<p style="text-align: center;">Regular</p> 	<p>Se observan blastómeros extruidos, vesículas y algunas células degeneradas. Embriones obtenidos de siete días de una vaca donadora superovuladas. Arriba a la izquierda ovulo no fecundado ovulo no fecundado, abajo a la izquierda y en el centro mórulas compactas, a la derecha blástulas tempranas</p>
<p style="text-align: center;">Malo</p> 	<p>Hay blastómeros extruidos, células degeneradas, diferentes tamaños, vesículas grandes y numerosas, aparentemente se ve una masa embrionaria viable, no son de calidad transferible. Embriones bovinos de siete días de edad gestacional. A la izquierda blastocitos expandidos, a la derecha arriba ovulo no fecundado y a la derecha abajo blastocito temprano</p>

MATERIAL

De acuerdo a lo anterior la producción *in vivo* de embriones bovinos envuelve numerosos pasos, los cuales son simples en sí mismos, pero dada la complejidad del conjunto requiere de la organización de un grupo humano especialmente entrenado y capacitado para la atención minuciosa de cada detalle así como de materiales indispensables en cada procedimiento, por lo cual se describe los materiales que son necesarios:

1. Biológico

Pajillas de semen.

Vaca donadora (**Ver Anexo A**).

Hormonas: PGF2 α (LUTALYSE), GnRH (FERTAGYL), FSH (PLUSET o FOLLTROPIN) (Ver Anexo B y C).

2. Inseminación artificial

Termo con nitrógeno líquido (NL₂) y pajillas de semen.

Pinzas para sacar las pajillas del termo.

Termo para descongelar el semen.

Tijeras filosas de acero inoxidable para cortar las pajillas.

Toallas para limpieza de las vacas (zona perineal).

Pistola de inseminación.

Fundas desechables de plástico.

Guantes desechables para palpación rectal.

Overol y botas.

Cuaderno con lápiz (**Ver Anexo D**).

3. Lavado de embriones

Filtro para recolección de embriones (EMCON).

Medio de recolección (ViGRO COMPLETE FLUSH, BIONICHE ANIMAL HEALTH USA. INC).

Sonda de lavado (FOLEY, 2 VÍAS, 16 A 20 FR., GLOBO 5 O 30 CC, BARDIA).

Manguera (TYGON LARGA 152cm, IRRADIADA, MCA AGTECH)

Jeringas (NORM-JECT DE 8, 20 Y 50ML).

Guantes de palpación rectal.

Toallas para limpieza de la vaca (zona perineal).

Termómetro

Baño María preparado a 37°C.

Tijeras

Tiras adhesivas

Rotulador

Overol y botas, (**Ver Anexo E**).

J. COSTOS ESTIMADOS.

Para establecer los costos de producción *in vivo* de embriones bovinos se identifican los siguientes componentes: sincronización de la ovulación (Ovsynch), superovulación, inseminación artificial, equipos e insumos de laboratorio, mano de obra; considerando la mano de obra calificada de los profesionales y la mano de obra de los trabajadores y/o auxiliares, el lavado de embriones y la evaluación de los embriones obtenidos, ver Cuadro 7.

Cuadro 7. Costos estimados de producción in vivo de embriones.

En una vaca con las condiciones adecuadas (Acevedo, 2015).

Concepto	Nombre comercial	Costo \$	Cantidad a utilizar	Costo Final del tratamiento
Ovsynch	GnRH (Fertagyl® 5ml Intervet)	\$250 [5 ml]	2 ml	\$100
	PgF2α (Lutalyse® 30 ml Zoetis)	\$250 [30 ml]	6 ml	\$51
	Mano de obra	\$150	3	\$450
Superovulación	FSH (Pluset® 20 ml)	\$2200	20 ml	\$2200
	PgF2α (Lutalyse® 30 ml Zoetis)	\$250 [30 ml]	6 ml	\$51
	Mano de obra	\$100	4	\$400
Inseminación Artificial	Pajilla de 0.5 cm	\$250	2	\$500
	Material	\$500	Varios	\$500
	Mano de obra MVZ	\$400	1	\$400
Lavado de embriones	Material	Varios	\$2648	\$2648
	Mano de obra MVZ	\$400	1	\$400
	Mano de obra (ayudante)	\$150	1	\$150
Evaluación de embriones	Material de laboratorio	\$1500	Varios	\$1500
	Mano de obra MVZ	\$400	1	\$400
	Mano de obra (ayudante)	\$150	1	\$150
Subtotal				\$9900
Embriones/lavado	Promedio de embriones por vaca/lavado 6.3	-----	\$9900/6.3embriones	Costo por embrión \$1,571

Sin tomar en cuenta la alimentación y el costo de la vaca que se someta a esta biotecnología, en promedio la producción *in vivo* de un embrión bovino es de \$1,571., según Bolívar, 2008., el costo más bajo registrado es de \$1,355.1 pesos y puede llegar a elevarse hasta los \$1,604.5 pesos, estos son los costos de la producción de cada embrión contando con una ineficiencia en los procesos del 50%.

VI. CONCLUSIONES

La implementación del programa Ovsynch funciona para realizar IATF.

El desarrollo y aplicación de estas técnicas optimiza el uso las hormonas que pueden ser usadas para controlar el estro en el período post-parto, para mejorar la eficiencia reproductiva.

Se necesita realizar más investigación para determinar los costos y beneficios asociados a la implementación de estos procedimientos en pequeñas unidades de producción.

La producción *in vivo* de embriones bovinos, es una alternativa para aumentar la producción animal con la influencia genética tanto del toro como de la vaca, siempre que se cumpla con todos materiales necesarios, las condiciones fisiológicas de la vaca y todos los procedimientos involucrados.

VII. RECOMENDACIONES

Tener historial clínico, sanitario y reproductivo de las vacas donadoras, deberá comprobarse la normalidad del ciclo estral, para ello deben observarse 2 ciclos estrales, la donadora debe mostrar el celo o haber sincronizado la ovulación y el intervalo entre estros debe ser normal, es decir entre 18 y 24 días promedio 21 días.

Adquirir experiencia en estos procedimientos para obtener los resultados deseados.

Los procedimientos reproductivos necesarios realizarlos con ayuda de ultrasonido.

VIII. LÍMITE DE ESPACIO

La recopilación de la información para la realización del presente trabajo se realizó en la Biblioteca del Área El Cerrillo y en la sala de cómputo de la FMVZ-UAEM.

IX. LÍMITE DE TIEMPO

La redacción del presente trabajo se realizó del mes de agosto a diciembre de 2015, mientras que la revisión del protocolo y correcciones de la tesina se llevaron a cabo de enero a mayo de 2016.

X. LITERATURA CITADA

- Acevedo LJ. (2015). Experiencia de campo con productores particulares y Farmacia Veterinaria Integral de Toluca (presupuesto de fármacos).
- AETE (2012): National Statistic Data of the Embryo Transfer activity. 28th Scientific Meeting of the AETE, Saint-Malo France. <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=5572>. (30 de Junio de 2015).
- Alta Genetics (2013): Technical of Insemination Artificial. http://web.altagenetics.com/us/DairyBasics/Details/6481_Artificial-Insemination-Instructional-Video.html. (27 de Enero de 2016).
- Baruselli MJ. (2005). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 65 (1):77-88.
- Becaluba y Becaluba. (2016). Nuevas tecnologías para el manejo de la detección de celo. www.produccionanimal.com.ar/informaciontecnica/inseminacionartificial/93manejodeteccioncelo (26 de Enero de 2016).
- Bó AG and Reuben JM. (2014): Historical perspectives and recent research on superovulación in cattle. *Theriology* 81:38-48.
- Bó AG and Mapletof RJ. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.* 10: 344-348.
- Bolivar AP y Maldonado EJG. (2008). Análisis de costos de esquemas de transferencia de embriones bovinos utilizados en Colombia. *Revi Colomb Cienc Pecu.* 21:351-364.
- Bradley GK. (2014). *Fisiología Veterinaria*. 5ª ed., Elsevier Saunders. España.
- Carballo GD, Tríbulo A, Tríbulo R, Tríbulo H, Bó GA. (2010). Superovulatory response in beef donors treated during the first follicular wave or four after progesterone and estradiol administration. *Reprod Fertil Dev.* 22:358.
- Colazo MG y Mapletoft RJ. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria.* 9: 20-37.

Church DC, Pond WG, Pond KR. (2012). Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales. 2ª ed., Limusa. México.

De la Fuente J. (2012). Reproducción Asistida en el Vacuno de Leche: Selección y Superovulación.

http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/16_11_49_2_CORDOBA.pdf.

(25 de Abril de 2016).

Duran RF. (2010). Inseminación y Transferencia de embriones en animales de granja. 1ª ed., Grupo Latino, Colombia.

Durrant BS. (2009). The importance and potential of artificial insemination in CANDS (companion animals, non-domestic, endangered species). Theriology 71. 113-122.

Elsden RP, Nelson LD and Seidel GE Jr. (1978). Superovulating hormone and pregnant mare's serum gonadotropin Theriogenology 9: 17-26.

Ergomix.com (2011). Argentina - Inseminación Artificial y Transferencia de embriones: Curso de Agrocor. <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/noticias/argentina-inseminacion-artificial-transferencia-t17020/p0.htm>. (18 Marzo de 2016).

Estrada KS, Alanusa AL, Romero ZJJ, Galindo BJ, Galina HC. (2012). Utilidad de la palpación rectal y la ecografía transrectal en el diagnóstico de gestación del ganado cebú en el trópico húmedo de Costa Rica. Revista Científica, XXII (2):45-56.

Farin PW and Farin CE. (1995). Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. Biology of Reproduction 52: 676-682.

Farin PW, Slenning BD and Britt JH. (1999). Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. Theriogenology 52:659-670.

Fernández LC y De la Barrera. (2009). Reproducción Aplicada en el Ganado Bovino Lechero. 2ª ed., Trillas, México.

- Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, and Crowe MA. (2011) Oestrous cycles in Bos Taurus cattle. *Animal Reproduction Science* 124:163-169.
- García MJ y Gil CF. (2012). *Embriología Veterinaria: Un Enfoque Dinámico Del Desarrollo Animal*. 2ª ed., Intermedica. Argentina.
- Garzón N, Urrego R y Giraldo AC. (2007). Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2:68-77.
- Gordon I. (1994). *Laboratory production of cattle embryos*. Editorial CAB INTERNATIONAL. Cambridge, Inglaterra.
- Gorlach, A. (1997). *Transferencia de embriones en el Ganado vacuno*. Editorial Acribia, Zaragoza España.
- Hafez B and Hafez ESE. (2000). *Reproduction in Farms Animals*. 7ª ed., Loppincott Williams & Wilkins.
- Hafez ESE y Hafez B. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7a ed., Mc Graw Hill.
- Halley SM, Rhodes RC, Mckellar LD and Randel. (1979). Successful superovulation, nonsurgical collection and transfer of embryos from Bhraman cows. *Theriogenology* 12:97-108.
- Hansel W, Malven PV and Black DL. (1961). Estrous cycle regulation in the bovine. *J. Anim. Sci.* 20:621-625.
- Hasler JF, Mccauley AD, Lathrop WF and Foote RH. (1987). Effect of donor – embryo – recipient interactions on pregnancy rate in large scala embryo transfer program. *Theriogenology*. 27:139-168.
- Hasler JF. (2013). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci.* 79:245-264.
- He X, Park EY, Fowler A, Yarmush ML, Toner M. (2008): Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz microcapillary: a study using murine embryonic stem cells. *Cryobiology*. 56:223-232.

Herradón PG, Quintela LA, Becerra SR y Fernández M. (2007). Fecundación *in vitro*: alternativa para la mejora genética en bovinos. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 15: 33-40.

Jones AL and Lamb GC. (2008) Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. Theriogenology. 69:107-115

Keller DS, Teepker G. (1990). The effect of variability in response to superovulation on donor cow selection differentials in nucleus breeding schemes. J Dairy Sci. 73: 549-554.

Kelly P, Duffy RJF and Boland MP. (1997): Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. Animal Reproductive Science 46:1-14.

Lamb GC, Smith MF, Perry GA, Atkins JA, Risley ME, Busch DC, and Patterson DJ. (2009). Reproductive Endocrinology and Hormonal Control of the Estrous Cycle., University of Florida.

Lamond, DR. (1964). Synchronization of ovarian cycles in sheep and cattle. Anim. Breed. Abstr. 32:269-285.

Lane EA, Austin EJ and Crowe MA. (2008): Oestrous synchronization in cattle – Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. Animal Reproduction Science. 109: 1-16.

Lewis I. (1990): Convencional embryo transfer. Cattle breeding Technologies. Reproducción Bovina. http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/10ReproduccionBovina.pdf. (25 de junio de 2015).

Machaty Z, Peippo J and Peter A. (2012): Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. Theriogenology 78: 937-950

Mapletoft RJ. (1985). Embryo transfer in the cow: General procedures. Rev sci tech Off int Epiz. 4:843-858.

- Mapletoft RJ. (1986). Bovine Embryo Transfer. In: DA Morrow, ed. Current Therapy in Theriogenology II. Philadelphia: WB Saunders Co. 54-63.
- Mapletoft RJ, Wu M y Murphy BD. (1988). Super ovulation of beef cattle. Proceedings of the eleventh international congress on animal reproduction and artificial insemination (Dublin) 2, Brief Communications No. 173.
- Muir WW, Hubbell EAJ, Bednarski MR, Skarda TR. (2008). Manual de Anestesia Veterinaria. 4ª ed., Elsevier Mosby. España.
- Papa MP, Maziero DR, Guasti NP, Junqueira RC, Freitas-Dell'Aqua PC, Vianna PFF, Alvarenga AM, Crespiho MA and Dell'Aqua Jr JA. (2015). Effect of glicerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. Theriogenology 83:107-113.
- Patterson DJ, Kojima FN and Smith MF. (2003): A review of methods to synchronize estrus in replacement heifers and postpartum beef cows. J. Anim. Sci. 81(2):166-177.
- Palma G. (2008). Biotecnología de la reproducción. 2ª ed., Inter-Médica, Argentina.
- Palasz AT and Mapletoft RJ. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Advances. Biotech Advan 14:127-149.
- Peippo J, Machaty Z, Peter A. (2011). Terminologies for the pre-attachment bovine embryo. Theriogenology 76:1373-1379.
- Prospero CV, César PA. (2012). Viabilidad Espermática e Integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. Rev Inv Perú 23 (2): 192-200.
- Pro Cows (2015). Productos Veterinarios para la Reproducción. <http://www.camposmex.com.mx/directorio2011/catalog.php?id=251>. (20 de Febrero de 2016).
- Pursley JR, Mee Mo, Wiltbank MC. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. Theriogenology 44(7):915-923.
- Rivera GMG. (2013). Manual de biotecnología reproductiva en bovinos. <http://manualbiotecnologiareproductiva.blogspot.mx/p/trasferencia-de-embriones.html> (27 de Abril de 2016).

- Rodriguez LA. (2012). Reproducción bovina agrocampo. <http://agrocamporeproductivo.blogspot.mx/2012/07/reproduccion-bovina-normal-0-21-false.html>. (20 de Marzo de 2016).
- Ruane J, Smith C. (1989). The genetic response possible in dairy cattle improvement by setting up a multiple ovulation and embryo transfer (MOET) nucleus scheme. *Genet Sel Eval*. 21:169-183.
- Ruvuna F, Taylor JF, Walter JP, Turner J W and Thallman RM. (1992). Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: III. Embryo lines for producing bulls. *Journal of animal science*. 4: 1091-1097.
- Selectsires.com (2015): Manejo de la reproducción http://www.infovets.com/books/spanish_dairy/A/A710.htm (27 de Enero de 2016)
- Seidel GE Jr and Seidel SM. (1991). Training manual for embryo transfer in cattle. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 77:164.
- Schneider HJ Jr, Casteberry RS and Griffin JL. (1980). Commercial aspects of bovine transfer. *Theriogenology* 13: 73-85.
- Stringfellow DA and Seidel SM (eds) Savoy (1998). Manual of the IETS. Third Edition. IL: IETS.
- Thibier M. (1990). New technologies in cattle reproduction, Proceedings of 7th FAVA Congress, Pattaya Thailand, 512-524.
- Thimonier J, Chupin D and Pelot J. (1975). Synchronization of estrus in heifers and cyclic cows with progestogens and prostaglandin analogues alone or in combination. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys*. 15:437-449.
- Tribulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Mapletoft RJ, Bó GA. (2012). Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two different concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*. 77:1679–85.
- UF/IFAS. (2016). Anatomía Reproductiva de la vaca en gestación. [http://animal.ifas.ufl.edu/ans3319/lab_notes\(docs/lab_1d_female_reproductive%20_anatomy.pdf](http://animal.ifas.ufl.edu/ans3319/lab_notes(docs/lab_1d_female_reproductive%20_anatomy.pdf) (15 de Julio de 2015).

Ümüt C, Bacinoglu S, Muzaffer T, Kamber D, Ahmet B, Kemal A and Irfan KÍ. (2008): Evaluation of short estrus synchronization methods in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 109:65-67.

Ümüt C. Kemal AK and Kamuran I. (2007): New Strategies to Improve efficiency of the Ovsynch protocol in primiparous dairy cows. *Bull Vet Pulawy* 51: 47-51.

Veerkamp RF and Beerda B. (2007). Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology* 68, S266-S273.

Walsh SW, Williams EJ and Evans ACO. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 123:127-138.

Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH, and Buckner PJ. (1951). Successful transplantation bovine ovum. *Science*, 113:247.

XI. ANEXOS

A. Lista de cotejo para selección de la vaca donadora.

Material	Descripción	
Vaca o vaquilla	>= 13 meses de edad y >= 350 kg PV.	√
Historial Sanitario y Clínico	Libre de <i>Brucella ssp</i> , Tuberculosis <i>ssp</i> , Condición corporal 2.5 a 3 puntos en escala de 1 a 5.	√
Historial Reproductivo	Observar 2 ciclos de 21 días cada uno.	√
Ultrasonido	Diagnosticar presencia de actividad reproductiva, folículos, cuerpos lúteos funcionales.	√

B. Lista de cotejo para sincronización de la ovulación.

Material	Descripción	
Vaca o vaquilla	Reproductivamente aptas.	√
PGF2 α (Lutalyse)	25 – 35 mg = 5 – 7 ml.	√
GnRH (Fertagyl)	100 μ g = 1 ml.	√
Jeringas	5 ml y 1 ml.	√
Aguja	18 x 1/20.	√
Reloj	Para ser exactos en la hora de aplicación.	√
Calendario	Para identificar el día exacto.	√

C. Lista de cotejo para superovulación.

Material	Descripción	
Vaca o vaquilla	Con la ovulación sincronizada o detección visual de estro.	√
FSH	(Folltropin o Lutalyse) Refiérase al apartado 6.3 Superovulación.	√
Jeringas	De 10, 3, 1 ml.	√
Aguja	18 x 1/20	√
Reloj	Digital para determinar con exactitud la hora de aplicación de las hormonas.	√
Calendario	Para identificar el día exacto.	√

D. Lista de cotejo para inseminación artificial.

Material	Descripción	
Vaca o Vaquilla	Sincronizada, detección de folículos.	√
Termo	Con NL ₂ y pajillas de semen.	√
Pinzas	Para sacar las pajillas.	√
Cortapajillas	Para realizar un corte más exacto.	√
Termo para descongelar	El agua debe estar de 35 – 37°C.	√
Guantes de plástico	Para palpación rectal.	√
Toallas de papel	Para limpieza de la vulva	√
Registro	Para describir el toro.	√
Reloj con segundero	Para tomar el tiempo de descongelación.	√
Calendario	Registrar la fecha exacta.	√

E. Lista de cotejo para lavado de embriones.

Material	Descripción	
Filtro (EMCON)	Para recolección del medio de lavado con embriones.	√
Medio (ViGRO) 1 Lt	Para lavado intrauterino.	√
Sonda (Foley 2 vías, 16 a 20 FR., globo 5 o 30 CC Bardia)	Para introducir el medio y extraer los embriones.	√
Dilatador cervical	Para introducir la sonda Foley.	√
Manguera (TYGON LARGA 1.52cm. Irradiada, MCA AGTECH)	Para conectarla con la sonda tipo Foley e introducir el medio de lavado.	√
Jeringas	De 8, 20 y 50 ml.	√
Toallas	Para limpieza de zona perineal.	√
Termómetro de laboratorio	Para medir la temperatura del medio de lavado (36°C).	√
Tijeras	Material de apoyo.	√
Tiras adhesivas	Para identificar el medio.	√
Rotulador	Anotar fecha.	√
Overol y botas	Por bioseguridad.	√

F. Evaluación de embriones.

Material	Descripción	
Placas de Petri Cuadrículadas	Para colocar los embriones contenido en medio de lavado.	√
Microscopio estereoscópico	Para identificar y evaluar los embriones.	√
Medio de mantenimiento "Sigro Holding", 8 ml, Bioniche	Para mantener los embriones en el laboratorio.	√
Jeringa	Para manipular los embriones.	√

G. Efecto del estadio del embrión sobre la tasa de preñez

Estadio	Embriones transferidos	Preñez	
		n°	%
Mt	586	359	61 ^a
Mc	1178	792	67 ^b
Bt	600	402	67 ^b
Be	139	99	71 ^c
Total	2503	1652	66

^{a, b} tasas de preñez con diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05)