



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



**EVALUACIÓN DE LA ASPIRACIÓN FOLICULAR Y LA
TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN VACAS *Bos indicus* DE
LA REGIÓN DE TIERRA CALIENTE, MICHOACÁN**

TESIS QUE PRESENTA:

AMAIRANI DANAE VARGAS PANIAGUA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA
ZOOTECNISTA

ASESOR:

M.C. Juan Carlos Tinoco Magaña

Morelia, Michoacán, octubre de 2019



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



**EVALUACIÓN DE LA ASPIRACIÓN FOLICULAR Y LA
TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN VACAS *Bos indicus* DE
LA REGIÓN DE TIERRA CALIENTE, MICHOACÁN**

TESIS QUE PRESENTA:

AMAIRANI DANAE VARGAS PANIAGUA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA
ZOOTECNISTA

Morelia, Michoacán, octubre de 2019



Aprobación de Impresión del Trabajo

Morelia, Michoacán, a 18 de septiembre de 2019

MC. JORGE ARTURO ARANA SANDOVAL

Director de la FMVZ-UMSNH

P R E S E N T E .

Por este conducto hacemos de su conocimiento que la tesis titulada: "EVALUACIÓN DE LA ASPIRACIÓN FOLICULAR Y LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN VACAS *Bos indicus* DE LA REGIÓN DE TIERRA CALIENTE, MICHOACÁN", del P. MVZ. AMAIRANI DANAE VARGAS PANIAGUA, dirigida por el asesor MC. JUAN CARLOS TINOCO MAGAÑA, fue *revisada y aprobada* por esta mesa sinodal, conforme a las normas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

A T E N T A M E N T E


MC. BEATRIZ SALAS GARCÍA
PRESIDENTE


MC. LESLIE GARATE GALLARDO
VOCAL


MC. JUAN CARLOS TINOCO MAGAÑA
(ASESOR)

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado a todas aquellas personas con grandes sueños y metas, que no permiten que los miedos y la mala vibra se interpongan entre ellos y sus objetivos.

Está dedicada a aquellos soñadores en grande que no temen enfrentarse al mundo por cumplir lo que desean en esta vida, porque si sus sueños son grandes su capacidad para lograrlos también lo es.

“Sueño, pongo a prueba mis sueños en contra de mis creencias, me atrevo a arriesgarme y ejecuto mi visión para hacer realidad esos sueños”

- Walt Disney

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mi madre Juana Candelaria Paniagua Gutiérrez por ser la mejor mamá del mundo, mi mejor amiga, mi confidente, mi paño de lágrimas cuando la he necesitado, y por apoyarme a cumplir el sueño de ser médica veterinaria zootecnista, ya que sin su apoyo incondicional y todo el amor que me ha dado yo no sería la persona que soy ahora y no hubiera podido llegar tan lejos como ahora lo he hecho.

Agradezco infinitamente a Víctor Manuel Navarro González, quien ha sido aquella figura admirable que tanto necesitaba en mi vida, y que ha llenado la vida de mi pequeña familia de alegría amando infinitamente a mi madre y también compartiendo su cariño hacia mi pequeño hermano Emilio Obed Medina Paniagua y hacia mí.

También quiero agradecer al ingeniero José González Ramírez, quien se ha encargado prácticamente de ser mi mano derecha en todo trámite y objetivo que he necesitado cumplir para llevar a cabo cada uno de mis sueños y mis metas.

Estoy infinitamente agradecida con todo el personal que conforma el Rancho Galeana, José Luis Dos Santos Neto quien fue mi asesor de servicio social, y todos los trabajadores del rancho, ya que me permitieron aprender mucho más que solo manejo en ganado bovino; y también con los médicos que conforman In Vitro Brasil ya que en cada una de sus visitas al rancho fueron muy amables en compartirme sus conocimientos y permitirme realizar mi trabajo de tesis en conjunto con ellos.

Les doy las gracias también a la Asociación Ganadera Local de Apatzingán por permitirme realizar mi servicio social y así poder realizar con más facilidad mi trabajo de tesis.

Y finalmente le agradezco infinitamente al M.C. Juan Carlos Tinoco Magaña por haberme asesorado durante todo el proceso de la tesis y también por haberme tenido paciencia.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	HIPÓTESIS	2
III.	OBJETIVOS	3
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1.	Situación actual de la ganadería en México	4
4.1.1.	Situación actual de la ganadería en Michoacán	4
4.2.	Fisiología de la reproducción.....	5
4.2.1.	Eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....	5
4.2.2.	Ciclo estral.....	11
4.2.2.1.	Ovogénesis	15
4.2.2.2.	Foliculogénesis	18
4.2.3.	Características del ovocito bovino	22
4.2.4.	Factores que modifican la dinámica folicular	23
4.2.4.1.	Condición corporal	23
4.2.4.2.	Estrés calórico.....	24
4.2.4.3.	Amamantamiento	26
4.3.	Antecedentes e importancia de las biotecnologías reproductivas.....	27
4.4.	Biotecnologías reproductivas para el mejoramiento genético	29
4.4.1.	Aspiración folicular (OPU) <i>in vivo</i> en la vaca.....	29
4.4.1.1.	Ventajas y desventajas	29
4.4.1.2.	Resultados esperados	30
4.4.1.3.	Descripción de la técnica de la OPU.....	31
4.4.1.4.	Colecta y transporte de los ovocitos	34

4.4.1.5.	Clasificación de los ovocitos	35
4.4.1.6.	Selección de los ovocitos	37
4.4.1.7.	Transporte de los ovocitos	37
4.4.1.8.	Componentes de los medios de cultivo.....	38
4.4.1.9.	Factores que intervienen en la eficiencia de la OPU.....	39
4.4.1.9.1.	Donadoras.....	39
4.4.1.9.2.	Razas	40
4.4.1.9.3.	Frecuencia y momento de la OPU relativos al momento del ciclo estral	40
4.4.1.9.4.	Variaciones entre los operadores.....	41
4.4.2.	Fertilización <i>in vitro</i> de los ovocitos (FIV)	41
4.4.2.1.	Ventajas y desventajas	41
4.4.2.2.	Resultados esperados	42
4.4.2.3.	Descripción de la técnica de la FIV	43
4.4.2.4.	Factores que intervienen en la eficiencia de la FIV	46
4.4.2.4.1.	Temperatura y tiempo en el transporte de los ovocitos	47
4.4.2.4.2.	Selección de los ovocitos	47
4.4.2.4.3.	Toros.....	47
4.4.2.4.4.	Preparación espermática para la FIV	48
4.4.2.5.	Desarrollo <i>in vitro</i>	50
4.4.2.6.	Mantenimiento de los embriones	51
4.4.3.	Criopreservación de los embriones	52
4.4.4.	Transferencia de embriones (TE)	56
4.4.4.1.	Ventajas y desventajas	56
4.4.4.2.	Resultados esperados	57

4.4.4.3.	Descripción de la técnica de la TE	57
4.4.4.4.	Selección de las hembras receptoras de acuerdo a la presencia de cuerpo lúteo	59
4.4.4.5.	Diagnóstico de gestación	60
4.4.4.6.	Factores que intervienen en la eficiencia de la TE	60
4.4.4.6.1.	Medio ambiente.....	61
4.4.4.6.2.	Prácticas de manejo.....	61
4.4.4.6.3.	Condición corporal	61
4.4.4.6.4.	Cuerpo lúteo.....	61
4.4.4.6.5.	Estado de desarrollo del embrión.....	62
4.4.4.6.6.	Dificultades técnicas al momento de realizar la TE....	62
4.4.4.6.7.	Protocolo de sincronización hormonal para hembras receptoras	63
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	64
5.1.	Materiales	64
5.1.1.	Ubicación del lugar	64
5.1.2.	Selección de los animales	65
5.2.	Metodología	66
5.2.1.	Aspiración de los ovocitos	66
5.2.2.	Colección y evaluación de los ovocitos	70
5.2.3.	Envase y transporte de los ovocitos	74
5.2.4.	Fertilización <i>in vitro</i>	76
5.2.5.	Transferencia de embriones	76
5.2.6.	Diagnóstico de gestación.....	82
5.3.	Análisis estadístico	82
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84

VII.	CONCLUSIÓN	89
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Sistema porta-hipotálamo-hipofisiario.....	7
Figura 2.	Retroalimentación entre el hipotálamo, hipófisis y el ovario	11
Figura 3.	Etapas del ciclo estral.....	12
Figura 4.	Cambios endócrinos, fisiológicos y en el comportamiento asociados al estro.....	13
Figura 5.	Maduración nuclear del ovocito	17
Figura 6.	La unidad folicular con sus estructuras.....	18
Figura 7.	Crecimiento y maduración del ovocito dentro del ovario	19
Figura 8.	Crecimiento y atresia folicular.....	22
Figura 9.	Transición del anestro a la ciclicidad relacionada a la condición corporal.....	24
Figura 10.	Diferentes efectos del estrés calórico en la reproducción.....	25
Figura 11.	El efecto residual del estrés calórico	26
Figura 12.	Equipo para realizar la OPU; a) ultrasonido con transductor y bomba de aspiración, b) sistema de guía de aguja conectado a un tubo colector	31
Figura 13.	Recolección de ovocitos	33
Figura 14.	Imágenes de ovario con folículos (f) y línea de punción (LP) que marca el recorrido de la aguja	34
Figura 15.	Clasificación de los ovocitos en a) GI, b) GII, c) GIII, d) Desnudos, e) Atrésicos.....	37

Figura 16. Cultivo en la estufa	43
Figura 17. Baño maría utilizado para descongelar el semen	44
Figura 18. Evaluación de la vitalidad y motilidad de los espermatozoides, y cámara de Neubauer para conteo de espermatozoides	45
Figura 19. FIV convencional	46
Figura 20. Técnica de Swim Up.....	49
Figura 21. Técnica de centrifugación en Percoll	50
Figura 22. Estadios embrionarios en periodo de cultivo	51
Figura 23. Congelador para congelación lenta	54
Figura 24. Vitricación de embriones.....	54
Figura 25. Momento de la TE	58
Figura 26. Protocolo de sincronización con PGF2 α	63
Figura 27. Entrada principal del Rancho Galeana	64
Figura 28. Selección de las vacas para aspiración folicular.....	65
Figura 29. Selección de las vacas para transferencia de embriones.....	66
Figura 30. a) Frasco de Pisacaína 2%, 20 mg/ml; b) Aplicación de la anestesia epidural.....	67
Figura 31. Ultrasonido DP 2200 Vet	67
Figura 32. Bomba de vacío Bx 003D, junto al ultrasonido	68
Figura 33. a) Limpieza de la vulva con papel para retirar el excremento; b) y después con alcohol al 70% para volver a limpiar con papel	68
Figura 34. a) Introducción del transductor por vía vaginal y palpación; b) Búsqueda de folículos para aspirar; c) Observación de los folículos a aspirar	69
Figura 35. Protección desechable en la guía de transductor con la aguja de aspiración	69

Figura 36. Tubos con ovocitos aspirados, cubiertos de la luz para evitar el daño hacia los ovocitos	70
Figura 37. Calentador de tubos TED con los tubos con ovocitos colectados .	71
Figura 38. Filtración de los ovocitos.....	71
Figura 39. Ovocitos filtrados en una nueva placa de Petri con solución Vigro	72
Figura 40. Clasificación de los ovocitos en a) GI, b) GII, c) GIII, d) Desnudos, e) Atrésicos o Citoplasmas	72
Figura 41. Colocación de los ovocitos clasificados viables en una caja de Petri nueva sobre la placa de calor WTA.....	73
Figura 42. Registro de los ovocitos aspirados con sus características y la hora de envase	74
Figura 43. a) Colocación del gas; b) marcado del tubo con rotulador para su identificación.....	75
Figura 44. Colocación de los tubos en la transportadora MICRO-Q 22	75
Figura 45. Palpación vía rectal	77
Figura 46. Ultrasonido portátil CTS-800.....	77
Figura 47. Transportadora de embriones MICRO Q TECHNOLOGIES.....	78
Figura 48. a) Pajilla con el embrión; b) Pistola para transferencia.....	79
Figura 49. Termo con nitrógeno líquido, en donde se encuentran contenidas las pajillas con los embriones.....	79
Figura 50. Termo descongelador eléctrico ABS	80
Figura 51. Introducción de la pistola por vía vaginal y palpación rectal para realizar la transferencia de embriones.....	81
Figura 52. Registro de los embriones transferidos y de las vacas que no recibieron la transferencia de embriones.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo hormonal asignado por In Vitro Brasil para transferencia de embriones.....	76
Tabla 2. Promedio de ovocitos aspirados en vacas <i>Bos indicus</i> en pastoreo .	84
Tabla 3. Clasificación de ovocitos viables de acuerdo al número de capas de células del <i>cumulus oophorus</i> obtenidos de vacas <i>Bos indicus</i> en pastoreo...	86
Tabla 4. Transferencia de embriones (<i>Bos indicus</i>) a vacas criollas bajo condiciones de pastoreo en la región Tierra Caliente.....	87

RESUMEN

La presente investigación tuvo como propósito evaluar dos biotecnologías de la reproducción, las cuales son la aspiración folicular (OPU) y la transferencia de embriones (TE), en el “Rancho Galeana” ubicado en el Estado de Michoacán, en la región de Tierra Caliente en el municipio de Apatzingán, con dirección Carretera Apatzingán-Aguililla km 12.5, C.P. 60710. Para la OPU, se utilizaron 44 vacas *Bos indicus* (Nelore, Gyr e Indubrasil) con edad entre 2 a 16 años. Para la TE, se utilizaron 94 vacas criollas con condición corporal entre 4 y 6, conforme la escala del 1 al 9. La evaluación de los resultados obtenidos se realizó mediante un análisis descriptivo y el uso de la Distribución de Chi Cuadrado. Como resultado, se obtuvo que la raza donadora con mayor cantidad de ovocitos aspirados es la Nelore, y que además, en este estudio presentó la cantidad más alta de ovocitos viables para la fecundación *in vitro*. También, se obtuvo como resultado que la mejor TE fue con embriones en fresco ya que registró una tasa de gestación más alta que con TE congelados. Se concluyó que la cantidad de ovocitos obtenidos es dependiente de la raza, y que la tasa de gestación depende de la técnica de TE utilizada.

Palabras clave: Aspiración folicular, transferencia de embriones, *Bos indicus*, ovogénesis, foliculogénesis

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate two reproductive biotechnologies, which are follicular aspiration (OPU) and embryo transfer (ET), in the “Rancho Galeana” located in the State of Michoacan, in the region of Tierra Caliente in the municipality of Apatzingan, with direction Carretera Apatzingan-Aguililla km 12.5, CP 60710. For the OPU, 44 *Bos indicus* cows (Nelore, Gyr and Indubrasil) were used, aged 2 to 16 years. For the ET, 94 Creole cows with body condition between 4 and 6 were used, according to the scale from 1 to 9. The evaluation of the results obtained was carried out by means of a descriptive analysis and the use of the Chi Square Distribution. As a result, it was obtained that the donor race with the highest number of aspirated oocytes is Nelore, and that in this study, it presented the highest amount of viable oocytes for in vitro fertilization. Also, it was obtained as a result that the best ET was with fresh embryos since it registered a higher gestation rate than with frozen ET. It was concluded that the amount of oocytes obtained is dependent on race, and that the gestation rate depends on the ET technique used.

I. INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías de la reproducción son un conjunto de técnicas que surgen como una opción para el mejoramiento genético, que permiten tener un control del genoma reproductivo y su difusión para lograr el incremento en la producción animal y en la calidad de los productos obtenidos a partir de éstos (Rodríguez *et. al.*, 2011).

Estas herramientas, que comenzaron con el descubrimiento de la aplicación de la inseminación artificial, se emprendieron con un objetivo principal, el cual es el control sanitario evitando así la diseminación de enfermedades; y posteriormente, conforme fueron descubriéndose e incorporándose nuevas biotecnologías, sus objetivos aumentaron debido a la peculiaridad de cada una de ellas, los cuales son el aumento de la productividad, el acortamiento del anestro, el reinicio de la actividad ovárica, el estímulo superovulatorio y la transferencia de embriones (Ugalde, 2014).

Actualmente, las biotecnologías reproductivas son utilizadas alrededor del mundo y con objetivos más específicos que les permiten tener un mejor rendimiento de los animales y de lo que desean obtener de éstos. Y ya no sólo son exclusivas de grandes industrias, sino que también han sido aceptadas por productores, comenzando con la inseminación artificial, pero también y más modernas, la aspiración folicular (OPU), la fertilización *in vitro* (FIV) y la transferencia de embriones (TE), las cuales, les han permitido a los ganaderos un aumento en la productividad y en el potencial genético de sus animales (Ugalde, 2014).

El presente trabajo es una selección literaria comparada con la aplicación experimental de dos biotecnologías de la reproducción, que son la OPU y la TE, y la posterior evaluación de los resultados obtenidos para determinar su eficiencia.

II. HIPÓTESIS

1. En vacas *Bos indicus* se obtienen en promedio 37 ovocitos por vaca, siendo viables el 70% de los ovocitos recuperados. 2. La tasa de gestación con transferencia de embriones en fresco (60%) es mayor que la tasa de la transferencia de embriones congelados (40%).

III. OBJETIVOS

- ✓ Determinar la cantidad de ovocitos colectados de vacas *Bos indicus* en sistema extensivo de la región de Tierra caliente, Apatzingán.
- ✓ Evaluar la calidad de los ovocitos obtenidos de vacas *Bos indicus*. en pastoreo.
- ✓ Calcular la tasa de gestación con transferencia de embriones en fresco y congelados en vacas criollas en pastoreo.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Situación actual de la ganadería en México

En México, el ganado bovino es el de mayor consumo debido a su carne, leche y otros derivados, así como por sus pieles. A consecuencia de la incorporación de razas *Bos indicus* ha habido un aumento en cuanto a la calidad y cantidad de los animales, generando 480 millones de dólares en exportación de bovinos en pie y 68 mil millones de pesos mexicanos en la producción de leche (SADER, 2018).

A nivel mundial, México ocupa el séptimo lugar como productor de carne de bovino (FAO, 2018).

Actualmente, México cuenta con un inventario de 1,148,111 toneladas de bovino productor de carne, y sus principales Estados productores son Veracruz con 150,619 toneladas, Jalisco con 136,882 toneladas, San Luis Potosí con 68,803 toneladas, Sinaloa con 61,663 toneladas y Chiapas con 60,933 toneladas (SIAP, 2019).

4.1.1 Situación actual de la ganadería en Michoacán

La superficie total del Estado de Michoacán es de 5,867,153 hectáreas, de las cuales, el 21% se destinan para uso agrícola, el 44% para uso ganadero, el 26% es de vocación forestal y el 9% restante se destina a otros usos; de las hectáreas destinadas para uso ganadero, el 96.5% corresponde a ganado productor de carne y el 3.5% a ganado productor de leche (Gobierno del Estado de Michoacán de Ocampo, 2016).

Michoacán actualmente ocupa el octavo lugar como Estado productor de bovinos carne, con un inventario de 54,419 toneladas de bovinos (SIAP, 2019).

Los principales municipios productores son Vista Hermosa con 29,834 toneladas, Tepalcatepec con 2,551 toneladas, Huetamo con 2,392 toneladas, Arteaga con 1,996 toneladas, La Huacana con 1,987 toneladas y en sexto lugar Apatzingán con 1,799 toneladas (SIAP, 2019).

4.2 Fisiología de la reproducción

Las vacas son animales poliéstricos con ciclo estrales de alrededor de 21 días (Colazo y Mapletoft, 2014).

El ciclo estral se encuentra regulado por las hormonas del hipotálamo las cuales son la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH); en la hipófisis anterior la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH); en los ovarios la progesterona (P4), el estradiol (E2) y las inhibinas; y en el útero las prostaglandinas (PGF2, PGF2 α , PGF) (Colazo y Mapletoft, 2014).

Estas hormonas actúan a través de un sistema de retroalimentación positiva y un sistema de retroalimentación negativa para gobernar el ciclo estral de la hembra (Colazo y Mapletoft, 2014).

4.2.1 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario

En las vacas, el eje hipotálamo-hipófisis-ovario se encarga de controlar la actividad reproductiva, regulando así la interacción entre los mecanismos endócrino y parácrino, los cuales a su vez involucran factores de crecimiento y otras sustancias producidas localmente en los ovarios (Franco y Uribe, 2011).

El mecanismo endócrino se encuentra regulado por el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios, ya que actúan sobre células diana; y uno de los reguladores del mecanismo parácrino es la acción de las prostaglandinas sobre el útero (Brandan, 2014).

El hipotálamo se encuentra localizado en la base del cerebro y está formado por núcleos pares de neuronas, y tiene comunicación con la hipófisis mediante un sistema circulatorio específico llamado sistema porta-hipotálamo-hipofisiario (Hernández, 2017).

El sistema porta-hipotálamo-hipofisiario está conformado por las relaciones vasculares entre el sistema nervioso y la hipófisis, en donde la irrigación es suministrada por la carótida a través de las arterias hipofisiarias superior e inferior, y las conexiones neurales y vasculares entre el hipotálamo y el lóbulo posterior de la hipófisis se encuentran en el tracto hipotalámico-hipofisiario (Figura 1) (Hafez y Hafez, 2005; Brandan, 2011).

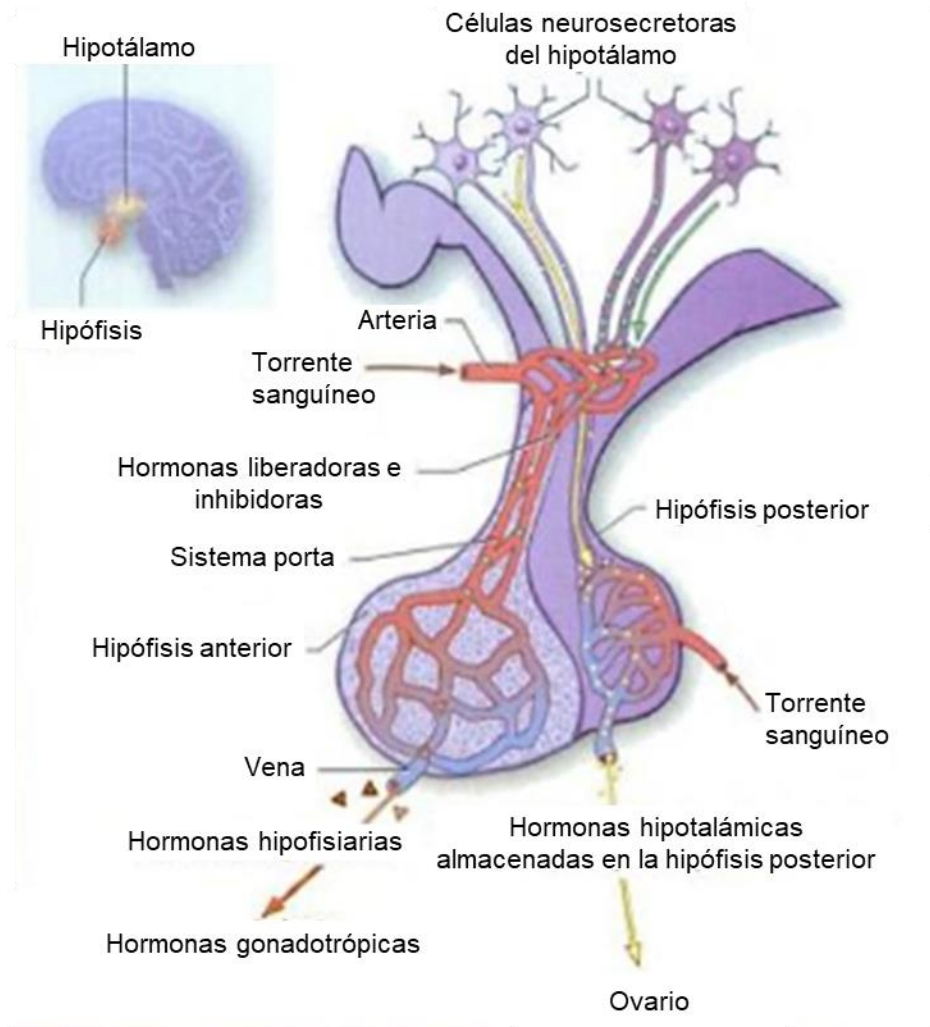


Figura 1. Sistema porta-hipotálamo-hipofisiario. (Curtis *et. al.*, 2008).

La hipófisis se encuentra localizada en una depresión ósea en la base del cerebro, llamada silla turca. Esta glándula se subdivide en tres partes anatómicas distintas: lóbulos anterior, intermedio y posterior (Hafez y Hafez, 2005).

En el lóbulo anterior de la hipófisis se encuentra un grupo de células llamadas gonadotrópicas, las cuales se encargan de secretar FSH, LH y prolactina (Hafez y Hafez, 2005).

Las neuronas que se encuentran localizadas en el área ventromedial y en el área preóptica del hipotálamo secretan GnRH, la cual llega a la hipófisis mediante el sistema porta-hipotálamo-hipofisiario y se encarga de estimular la secreción de LH y FSH (Hernández, 2017).

La GnRH es sintetizada y después es almacenada en el hipotálamo basal medio, en donde proporciona un enlace humoral entre el sistema neural y el mecanismo endócrino, y debido a señales neurales, se liberan pulsos de GnRH hacia el sistema porta-hipofisiario para estimular la liberación de LH y FSH de la hipófisis anterior (Hafez y Hafez, 2005).

La FSH promueve el crecimiento y la maduración del folículo ovárico o folículo de Graaf, y en conjunto con la LH estimula la producción de estrógenos del folículo ovárico grande. La LH es la causante de la ruptura de la pared folicular y la ovulación, y también, de esta manera estimula a las células intersticiales del ovario (Hafez y Hafez, 2005).

Los estrógenos se encargan de estimular el desarrollo del útero y la secreción de prostaglandinas a través de un mecanismo en el que interactúan con receptores. Un aumento de estrógenos promueve el crecimiento del miometrio del útero y la posterior síntesis y liberación de PGF2 α para finalizar la fase lútea por ausencia de fertilización (Hafez y Hafez, 2005).

Los ovarios desempeñan funciones como la producción de células germinales o gametogénesis, y la secreción de hormonas gonadales. Las células de la teca interna del folículo de Graaf son una fuente primaria de estrógenos circulantes. Posterior a la ovulación, es decir, la rotura del folículo, las células de la granulosa y de la teca son

reemplazadas por el cuerpo lúteo (CL), el cual se encarga de secretar P4 (Hafez y Hafez, 2005).

Las inhibinas se sintetizan en los ovarios, y actúan como señales químicas a la hipófisis respecto al número de folículos que crecen en el ovario. De esta manera, reducen la secreción de FSH a nivel tal, que mantienen el número de ovulaciones a una por ciclo en el caso de la vaca (Hafez y Hafez, 2005).

La P4 disminuye la secreción de la GnRH, así como también la respuesta de la hipófisis a la GnRH, y de esta manera inhibe la maduración folicular y la ovulación. Si llega a darse la fecundación, la P4 se mantiene, y además el ovocito fecundado envía una señal desde el endometrio para expresar que ya hay un inicio gestacional, esta señal se da a partir de la secreción de Trofoblastina (Hernández, 2017).

A nivel del ovario, los estrógenos pueden influenciar la secreción de la causante de su liberación, es decir, de la FSH (Hafez y Hafez, 2005).

El sistema nervioso interviene en la regulación de la actividad de los ovarios a través de mecanismos de retroalimentación endócrina, vías neurales y control inmunoendócrino (Hafez y Hafez, 2005).

Los mecanismos de retroalimentación ocurren a nivel del hipotálamo y de la hipófisis, y dependiendo de la concentración hormonal en sangre, puede haber una retroalimentación estimuladora o positiva, o una retroalimentación inhibitoria o negativa (Hafez y Hafez, 2005).

En una retroalimentación estimuladora, concentraciones crecientes de una hormona causan incrementos subsecuentes de otra hormona. Por ejemplo, cuando se incrementa la liberación de estrógenos en la fase preovulatoria se activa la liberación abrupta de LH en la hipófisis, y esta sincronización es necesaria para liberar una oleada de LH y así provocar la ruptura del folículo dominante (Hafez y Hafez, 2005).

La retroalimentación inhibitoria involucra interrelaciones mutuas entre dos o más glándulas y órganos blanco. Por ejemplo, cuando la secreción de estrógenos aumenta disminuyen las concentraciones de FSH. De la misma forma, cuando las hormonas de la hipófisis alcanzan un cierto nivel, algunos núcleos del hipotálamo responden disminuyendo la producción de su hormona liberadora particular, y ocurre un descenso en la secreción de la hormona hipofisiaria, y una caída aún más baja para la función de la glándula blanco (Hafez y Hafez, 2005).

Tanto las hormonas de la hipófisis como las hormonas esteroideas, regulan la síntesis, el almacenamiento y la liberación de las hormonas hipotalámicas a través de dos mecanismos de retroalimentación: una vía corta y una vía larga (Hafez y Hafez, 2005).

La vía de retroalimentación corta permite que las gonadotropinas hipofisiarias intervengan en la actividad secretoria de las hormonas liberadoras sin la mediación de los ovarios. La vía de retroalimentación larga incluye una interacción entre los ovarios, la hipófisis y el hipotálamo (Hafez y Hafez, 2005).

Básicamente, lo que ocurre en la retroalimentación entre el hipotálamo, la hipófisis y el ovario, es que la GnRH estimula en la hipófisis la síntesis y secreción de LH y FSH. En la etapa prepuberal y en el anestro posparto los estrógenos inhiben la secreción de GnRH mientras que en el proestro y estro, la estimulan; posteriormente la P4 inhibe la secreción de la GnRH y disminuye la respuesta de la hipófisis a la GnRH. Y los

estrógenos y la inhibina se encargan de suprimir la secreción de FSH directamente en la hipófisis (Figura 2) (Hernández, 2017).

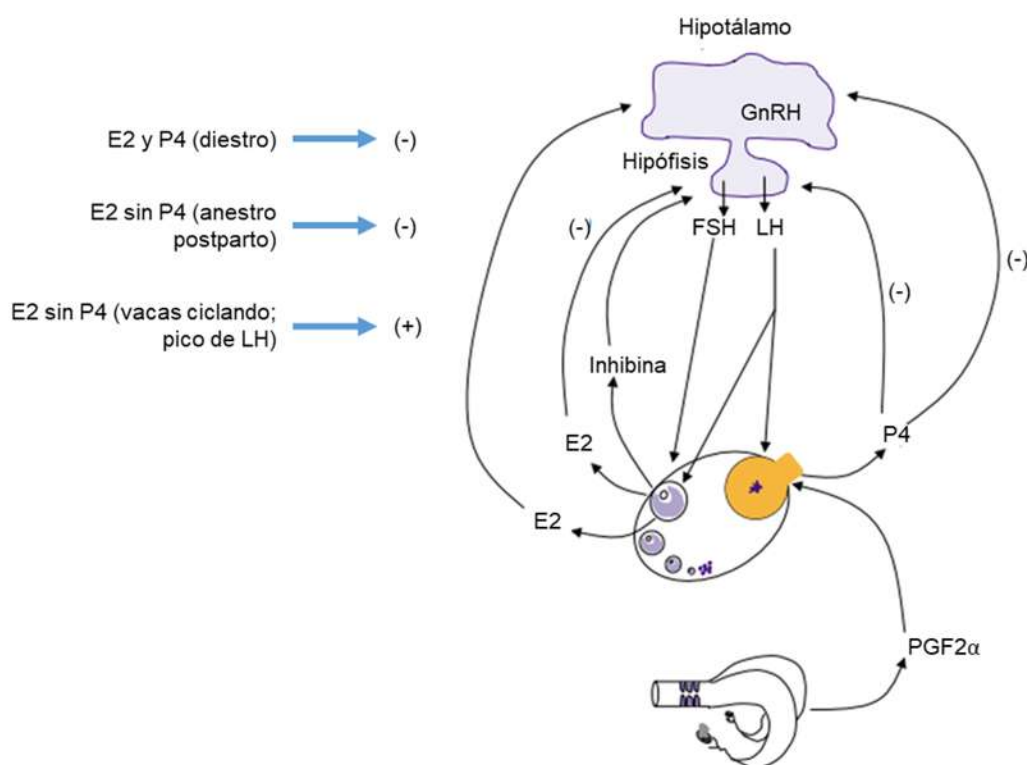


Figura 2. Retroalimentación entre el hipotálamo, hipófisis y el ovario (Hernández, 2017).

4.2.2 Ciclo estral

A nivel del ovario, el ciclo estral se caracteriza por una elevada secreción de estrógenos a partir de los folículos de Graaf preovulatorios (Hafez y Hafez, 2005).

El ciclo estral de la vaca tiene una duración de 20 a 21 días, y se encuentra dividido en cuatro etapas: estro, metaestro, diestro y proestro (Figura 3); que a su vez se dividen dos fases: la fase estrogénica que comprende el proestro y el estro; y la fase

progestacional que comprende el metaestro y el diestro (Hafez y Hafez, 2005; Hernandez, 2017).

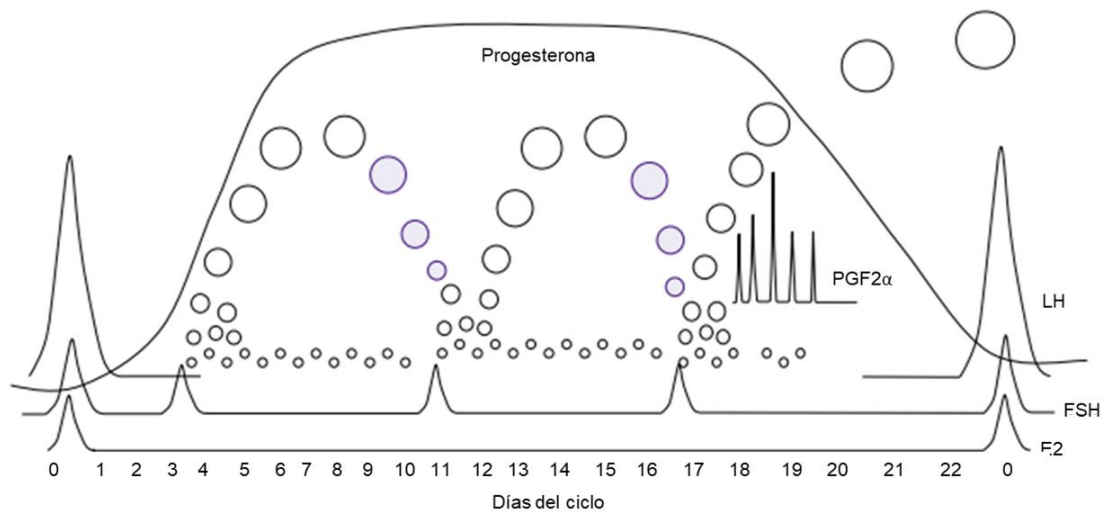


Figura 3. Etapas del ciclo estral (Hernández, 2017).

El estro es el periodo en donde la vaca acepta la monta de otra vaca. Esta etapa es provocada por el incremento de las concentraciones de E2 producido por el folículo preovulatorio y por ausencia de CL (Figura 4). La duración de esta etapa es de 8 a 18 horas (Hernández, 2017).

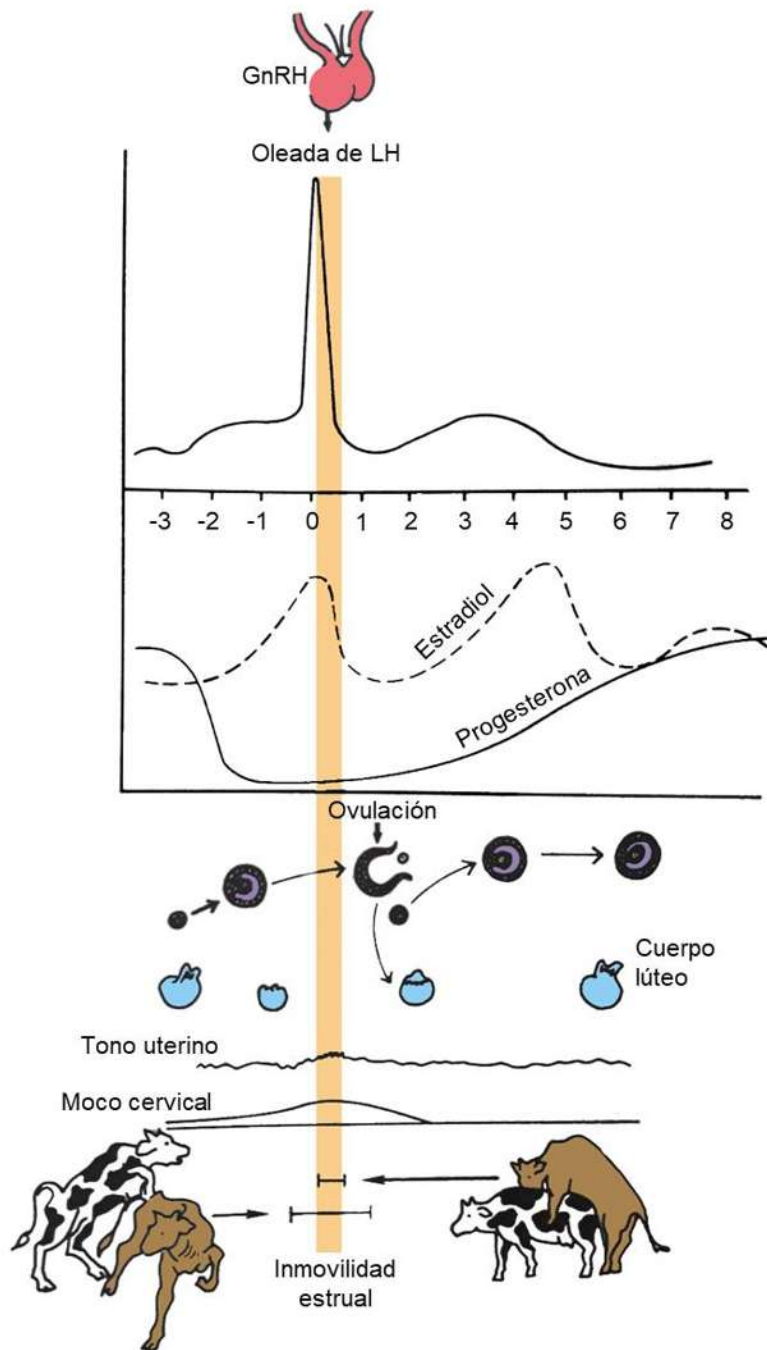


Figura 4. Cambios endócrinos, fisiológicos y en el comportamiento asociados al estro (Hafez y Hafez, 2005).

La duración del estro varía ligeramente de una hembra a otra dentro de la misma especie. Y esto también aplica con respecto al momento de la ovulación, la cual ocurre entre 24 y 30 horas después de iniciado el estro. También, es en esta etapa en donde ocurre el apareamiento (Hafez y Hafez, 2005).

El metaestro es el tiempo posterior al estro, y tiene una duración de 4 a 5 días. Durante esta etapa ocurre la ovulación y se desarrolla el CL. Cuando ocurre la ovulación, se genera una depresión ovulatoria en el lugar ocupado por el folículo y posteriormente se forma un cuerpo hemorrágico, el cual se desarrollará en CL (Hernández, 2017).

En el metaestro, cuando las concentraciones de P4 alcanzan niveles mayores de 1 ng/ml, se considera que el CL llegó a su madurez, y este es el criterio fisiológico para determinar el final del metaestro y el inicio del diestro (Hernández, 2017).

Otra característica importante del metaestro, es que ocurre un pico posovulatorio de FSH, el cual desencadena la primera oleada de desarrollo folicular (Hernández, 2017).

El diestro es la etapa más prolongada del ciclo estral, con una duración de 12 a 14 días. Durante este periodo el CL se mantiene funcional, lo que refleja concentraciones mayores a 1 ng/ml de P4. También, en esta etapa se pueden encontrar folículos de distintos tamaños debido a las oleadas foliculares ya que la LH se secreta con frecuencias muy bajas mientras que aumenta la presencia de la FSH (Hernández, 2017).

Cuando culmina el diestro, disminuye la producción de P4 y el endometrio comienza a secretar prostaglandina en un patrón pulsátil, con el fin de destruir el CL, y así dar inicio al proestro (Hernández, 2017).

El proestro es una etapa con una duración de 2 a 3 días y se caracteriza por la ausencia de un CL funcional y por el desarrollo y la maduración del folículo ovulatorio. En este periodo se incrementa la secreción de LH, lo cual provoca la maduración del folículo ovulatorio y el incremento de E2, y de esta manera se desencadena el estro (Hernández, 2017).

4.2.2.1 Ovogénesis

A partir de las primeras semanas del desarrollo embrionario, las llamadas células germinales primordiales se identifican como endoblasto extraembrionario caudal (Motta *et. al.*, 2011).

El endoblasto o endodermo es la capa embrionaria más profunda, y su porción extraembrionaria tiene íntima relación con el saco vitelino, en donde su segmento caudal se ubica cercano al área que dará origen a los genitales llamada membrana cloacal (López *et. al.*, 2013).

A los 35 días de gestación en la vaca, las células germinales primordiales migran a través del mesenterio de la cresta genital, y posteriormente a los 45 días de gestación ocurre la diferenciación sexual (Motta *et. al.*, 2011).

Entre los 45 y 110 días de la gestación ocurre el periodo de mitosis de ovogonias, es decir, es la etapa en la que ocurre la ovogénesis (Motta *et. al.*, 2011).

Al segundo tercio de la gestación, el ovario bovino contiene miles de ovogonias, específicamente en los folículos primordiales, los cuales son preantrales con una única

capa de células de la granulosa. Y en el último tercio de la gestación, comienzan los estadios de crecimiento folicular (Motta *et. al.*, 2011).

Al nacimiento, el número de ovocitos en los ovarios es muy variable, ya que pueden existir vacas con 0 hasta con 700,000 folículos, y una vez que la hembra entra a la pubertad se inicia el desarrollo folicular en donde ocurrirá la ovulación o la atresia (Motta *et. al.*, 2011).

Aproximadamente, son 60 días los que necesita un folículo primordial activado para llegar a la ovulación. En esta etapa, debido a las ondas foliculares, ocurren varias fases de crecimiento y atresia folicular con la subsecuente maduración o degeneración del ovocito (Motta *et. al.*, 2011).

Para que el núcleo del ovocito pueda madurar y contener el número haploide de cromosomas de la especie animal que se trate, tiene que pasar por el proceso de meiosis (Muñoz, 2011).

En los bovinos, alrededor de la séptima semana de gestación hay un aumento de las divisiones mitóticas y también se inicia la meiosis pero se detiene en profase I y no se reanuda hasta que se produzca el primer pico de LH, es decir, hasta la pubertad (Muñoz, 2011).

Una vez que la vaca alcanza la madurez sexual, llega el momento en el que se completa la división meiótica y se elimina el primer corpúsculo polar, es decir, el material genético sobrante (Muñoz, 2011).

Cuando el ovocito es fecundado se lleva a cabo la segunda división meiótica y se elimina el segundo corpúsculo polar. De esta manera se completa la maduración nuclear del gameto femenino ya que ha reducido la dotación cromosómica a la mitad, en el caso de los bovinos a 30 cromosomas haploides (Figura 5) (Muñoz, 2011).

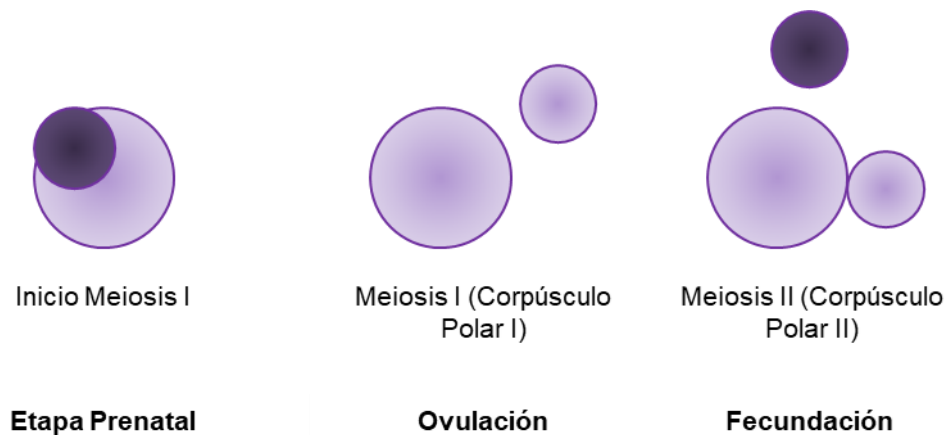


Figura 5. Maduración nuclear del ovocito (Muñoz, 2011).

El ovocito conforma al folículo, y se encuentra rodeado por la zona pelúcida, la cual a su vez está rodeada por células de la granulosa que entran en contacto con el ovocito a través de finas prolongaciones (Figura 6). Durante la maduración del ovocito las microvellosidades de las células de la granulosa se retraen, y comienza la ruptura del núcleo de la ovogonia (Muñoz, 2011).

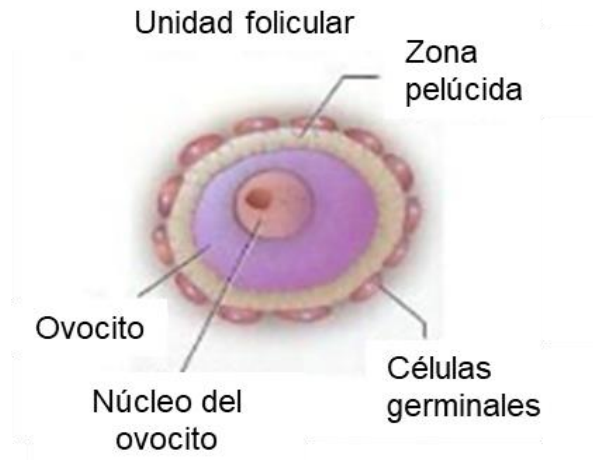


Figura 6. La unidad folicular con sus estructuras (Curtis *et. al.*, 2008).

4.2.2.2 Foliculogénesis

La fase folicular o foliculogénesis es una etapa comprendida entre el proestro y el estro, y se encuentra delimitada por el inicio de la regresión del CL hasta la ovulación (Franco y Uribe, 2011).

Esta fase se caracteriza por la liberación de gonadotropinas y el cambio en el predominio hormonal, en donde disminuye la P4 y aumentan los estrógenos (Franco y Uribe, 2011).

Es un proceso selectivo debido a que solamente un folículo asume dominancia mientras que el resto se atresia a través del proceso llamado apoptosis (Motta *et. al.*, 2011).

El folículo ovárico es una unidad estructural y funcional del ovario, el cual proporciona un ambiente apropiado para el crecimiento y ovulación del ovocito que contiene, y

posteriormente para la formación de un embrión a partir de la fecundación (Motta *et. al.*, 2011).

La foliculogénesis se lleva a cabo durante el estado fetal, antes de la pubertad y durante la gestación. Comienza a partir de un folículo primordial, el cual está conformado por un ovocito en crecimiento detenido antes del nacimiento en la profase I de la meiosis en el proceso de diploteno, y se encuentra rodeado por una sola capa de células de la pre-granulosa (Motta *et. al.*, 2011).

Los folículos primordiales comienzan a desarrollarse durante el periodo fetal; y el crecimiento y desarrollo de un folículo de Graaf y su posterior ovulación ocurre en la pubertad y en el metaestro. La síntesis de E2 por parte de las células de la granulosa regula el desarrollo y la atresia folicular (Motta *et. al.*, 2011).

Después de que el ovocito secundario es expulsado del folículo durante la ovulación, las células foliculares restantes dan origen al CL, el cual secreta estrógenos y P4. Si el ovocito no es fecundado, el CL se reabsorbe (Figura 7) (Curtis *et. al.*, 2008).

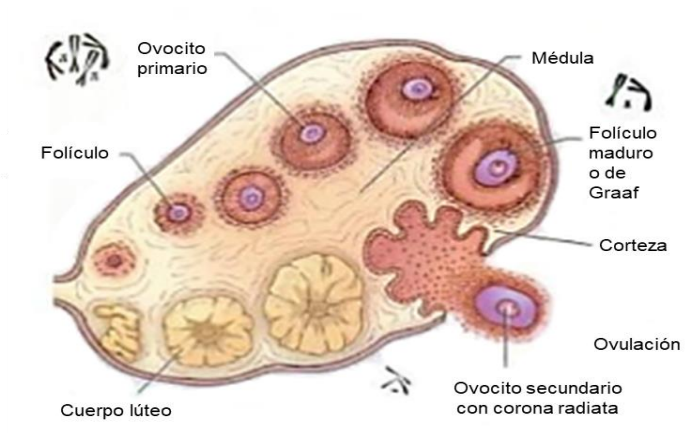


Figura 7. Crecimiento y maduración del ovocito dentro del ovario (Curtis *et. al.*, 2008).

En ausencia de una estimulación gonadotrópica adecuada, los folículos no continúan con su desarrollo. Pero los folículos bovinos con hasta 4 mm de diámetro no parecen necesitar un soporte gonadotrópico agudo, por lo que se consideran independientes de las gonadotropinas hasta este momento. Cuando los folículos se encuentran en estadios antrales es necesaria la presencia de la FSH para el crecimiento folicular ya que promueve la proliferación de las células de la granulosa desarrollando así folículos de 4 a 9 mm, y así impedir la atresia folicular. El pico de FSH plasmático está asociado con el momento del surgimiento de la onda folicular, cuando dicha concentración alcanza hasta 2 veces su concentración basal. En las vacas estos picos alcanzan hasta 6 ng/ml, y se presentan alrededor de 12 a 24 horas antes de la emergencia de la onda folicular (Franco y Uribe, 2011).

Dos días después del surgimiento de la onda folicular, comienza a disminuir la secreción de FSH y también comienza la atresia folicular (Franco y Uribe, 2011).

La LH estimula al AMPc de las células de la granulosa solamente en aquellos folículos con un diámetro mayor a 6 mm (el cual es un nucleótido mensajero de estas células), con el fin de generar receptores para unirse al folículo y posteriormente provocar la ovulación (Motta *et. al.*, 2011).

El patrón de secreción de la LH está determinado por tres características que son notorias durante el ciclo estral: concentración, amplitud y frecuencia. Estas características varían durante el ciclo estral ya que son completamente dependientes de la P4 y el E2 (Franco y Uribe, 2011).

Cuando hay altas concentraciones de P4 el CL es completamente funcional y se suprime la frecuencia de los pulsos de LH; y cuando hay altas concentraciones de E2, se induce la liberación de GnRH, la cual estimula la liberación de LH para estimular la

maduración del folículo dominante y posteriormente ocurra la ovulación (Franco y Uribe, 2011).

El momento de la ovulación es muy variable entre las distintas razas bovinas, y se presenta posterior al pico de LH, aproximadamente entre 24 y 30 horas después (Franco y Uribe, 2011).

Un pulso insuficiente de LH no estimula la ovulación y tampoco el desarrollo folicular, lo que puede desencadenar en un quiste folicular. El E2 puede causar esto debido a que su presencia afecta la liberación de LH y a su vez interferir con la maduración y ovulación del folículo (Franco y Uribe, 2011).

El tiempo de dominancia folicular influye en el potencial de los ovocitos para desarrollar un embrión, por lo que el porcentaje de concepción disminuye cuando ovulan folículos con más tiempo de dominancia que cuando ovulan folículos con menor tiempo de dominancia; normalmente el folículo dominante debe perdurar entre 4 y 6 días para considerar viable su ovocito para desarrollar un embrión (Figura 8) (Hernández, 2017).

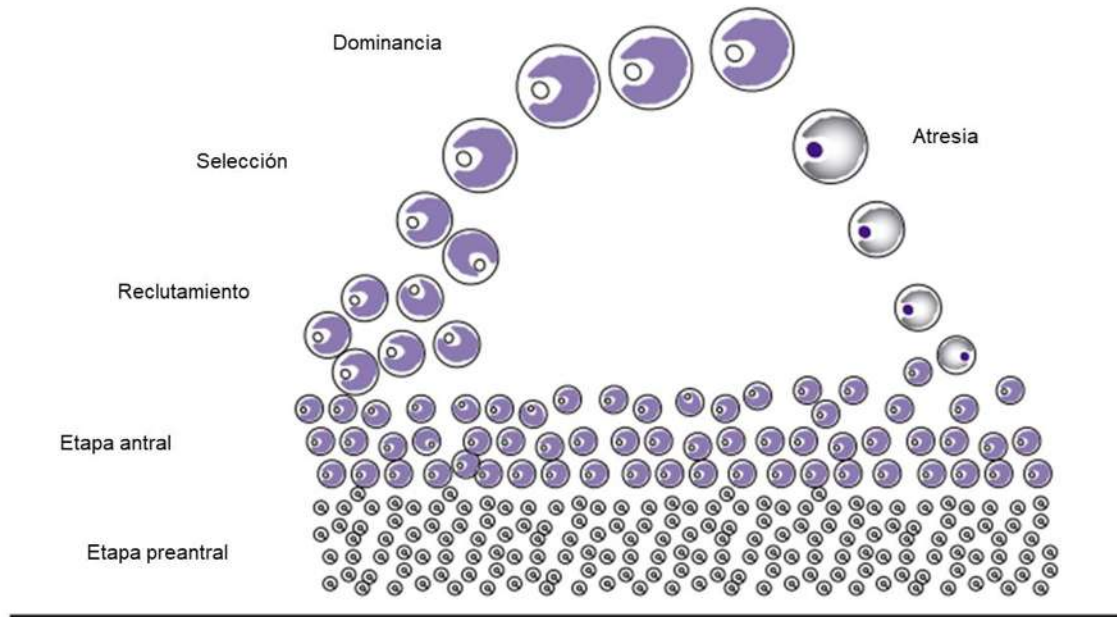


Figura 8. Crecimiento y atresia folicular (Hernandez, 2017).

4.2.3 Características del ovocito bovino

Los ovocitos de las vacas pueden llegar a tener un tamaño de 30 μm en estadios tempranos de desarrollo, y en condiciones de maduración pueden llegar a tener un diámetro aproximado de entre 120 y 125 μm (García, 2005).

Normalmente, el tamaño aproximado de los ovocitos es de 118 μm en terneras y 123 μm en vacas adultas (Armstrong, 2001).

Al mismo tiempo que incrementa el tamaño del ovocito también incrementa su capacidad para desarrollarse en blastocisto, considerándose que un ovocito inmaduro de al menos un diámetro de 135 μm se considera óptimo para el desarrollo a blastocisto (Albarracín, 2005).

4.2.4 Factores que modifican la dinámica folicular

Una característica que tienen las vacas es que su entrada al celo es un signo muy notorio debido al comportamiento de monta que llegan a presentar entre ellas. Y existen numerosos factores que influyen en que tengan un ciclo estral armónico y que puedan expresar el celo. Dentro de los factores más comunes se encuentran la condición corporal, el amamantamiento y el estrés calórico (Catalano y Callejas, 2001).

4.2.4.1 Condición corporal

La condición corporal y la nutrición de la hembra tienen un gran efecto sobre el crecimiento folicular. A medida que una vaca recupera o mejora su condición corporal produce folículos de diferentes tamaños que continúan de una manera adecuada su proceso de desarrollo hasta culminar en la ovulación. Pero cuando la condición corporal es muy baja, los folículos que se forman no crecen más allá de 4 mm, por lo tanto hay retraso en el inicio del estro y es más difícil detectar el celo. Las vacas que se encuentran en un rango de 3 a 5 en la escala de 1 a 9 para bovinos productores de carne, presentan un ciclo estral armónico (Frasinelli *et. al.*, 2004; Correa y Uribe, 2010; Oyuela y Jiménez, 2010).

Los cambios en la condición corporal se correlacionan positivamente con las concentraciones séricas de insulina, IGF-I y leptina, las cuales son factores de crecimiento. Así a mayor calificación de la condición corporal es mayor la concentración sérica de estas hormonas, las cuales tienen acción sobre señales que llegan al hipotálamo para modificar la frecuencia de GnRH y así provocar la transición del anestro a la ciclicidad (Figura 9) (Hernández, 2017).

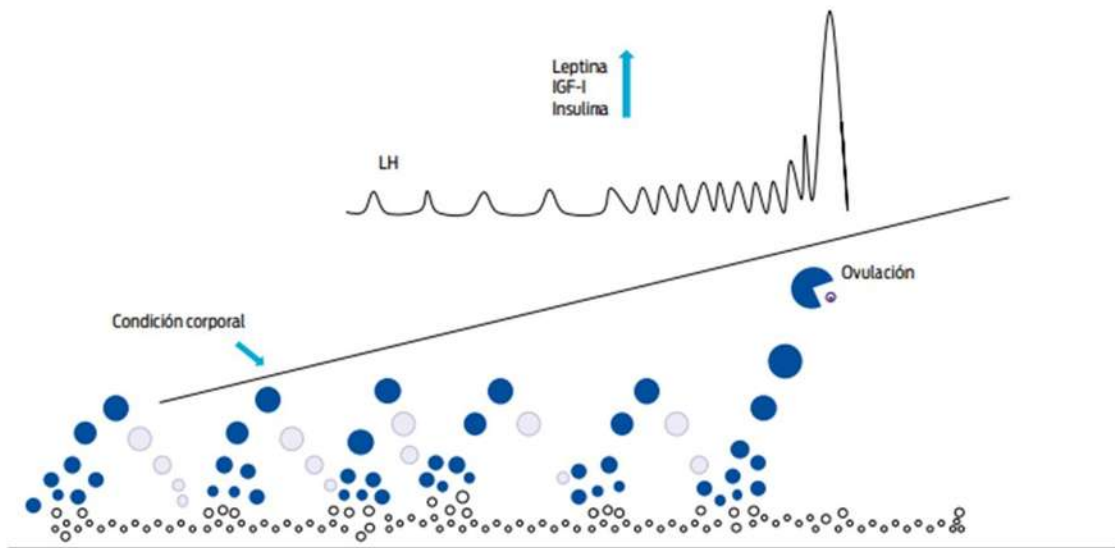


Figura 9. Transición del anestro a la ciclicidad relacionada a la condición corporal (Hernández, 2017).

4.2.4.2 Estrés calórico

El estrés calórico se presenta por la incapacidad de los animales para hacer frente a su entorno, y es un fenómeno que muy a menudo se refleja en la pérdida del potencial genético (Vélez y Uribe, 2010).

La reducción en el funcionamiento del ciclo estral se debe a una disminución de la actividad física provocada por altas temperaturas, y posteriormente también a la disminución de las concentraciones séricas de E2 (Hernández, 2017).

El estrés calórico tiene grandes posibilidades de generar efectos sobre la función reproductiva en los mamíferos (Figura 10). La regulación neuroendocrina del desarrollo folicular y de la ovulación requiere de la interacción entre las gonadotropinas hipofisiarias y la retroalimentación del E2 (Vélez y Uribe, 2010).

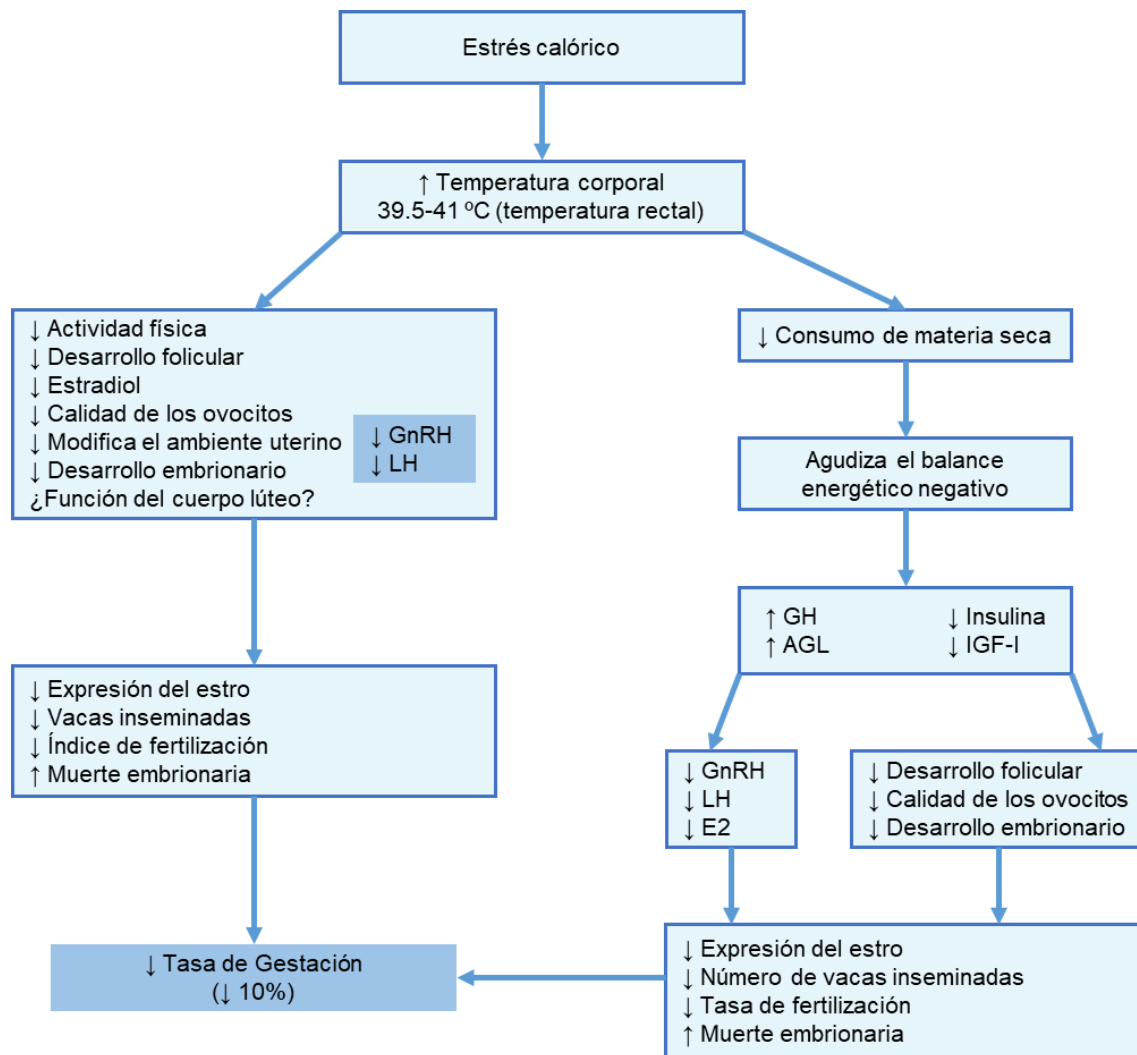


Figura 10. Diferentes efectos del estrés calórico en la reproducción (Hernández, 2017).

El estrés se puede considerar como un agente externo que en contacto con un animal genera un efecto sobre su actividad fisiológica (Vélez y Uribe, 2010).

Debido a que es compleja la interacción entre estas hormonas, la regulación de la fase folicular y posteriormente la regulación de la ovulación sí se ven afectadas por los efectos del estrés calórico ya que éste impacta sobre el eje reproductivo del hipotálamo afectando la secreción de GnRH y sobre el eje de la hipófisis afectando la secreción de gonadotropinas, con efectos directos sobre los ovarios (Vélez y Uribe, 2010).

El estrés calórico tiene efecto a largo plazo, lo que se conoce como efecto residual, y así en las vacas sometidas a climas con altas temperaturas se puede generar un efecto negativo en los ovocitos debido a que éstos reciben una temperatura muy alta durante las diferentes fases del desarrollo folicular (Figura 11) (Hernández, 2017).

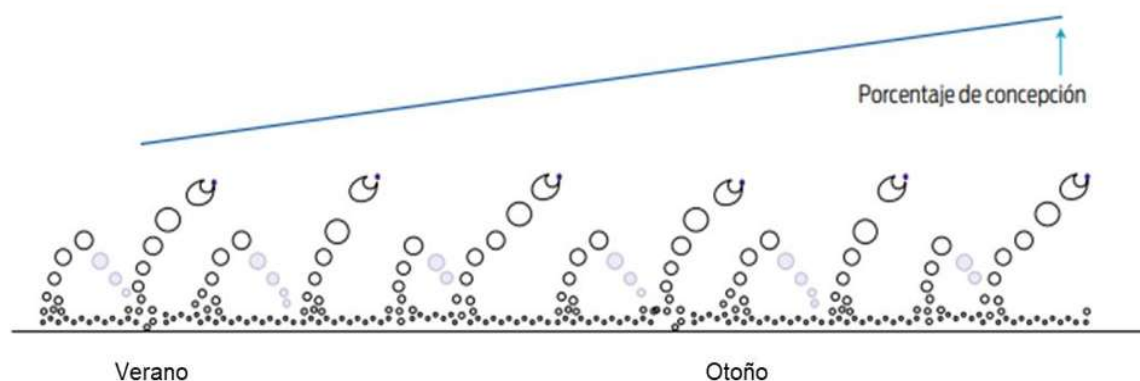


Figura 11. El efecto residual del estrés calórico (Hernández, 2017).

4.2.4.3 Amamantamiento

Cuando el ternero se encuentra mamando, se produce un efecto inhibitor de la actividad sexual. El estímulo del amamantamiento actúa sobre el hipotálamo para estimular la secreción de la oxitocina, disminuyendo así la liberación de GnRH, lo que a su vez provoca una menor secreción de LH, ya que la oxitocina tiene acción en el endometrio del útero para inducir la liberación de $\text{PGF2}\alpha$ y provocar una acción luteolítica (Catalano y Callejas, 2001; Hafez y Hafez, 2005); por lo tanto, aquellas hembras que se encuentran amamantando, presentan un intervalo posparto más extenso que aquellas hembras cuyas crías fueron destetadas o que su intensidad de amamantamiento fue menor. Este intervalo tan prolongado se conoce como anestro posparto, y provoca que las hembras presenten una marcada ineficiencia reproductiva que dificulta la meta del intervalo de un parto por vaca por año (Catalano y Callejas, 2001; Henao *et. al.*, 2002).

Durante el anestro posparto de las vacas *Bos indicus* el nivel de P4 sérica se encuentra muy por debajo de su secreción normal y los ovarios se encuentran disminuidos de tamaño o planos sin presencia de CL. A este tipo de condición se le conoce como ovarios lisos, función ovárica anormal posparto u ovarios estáticos (Henaó *et. al.*, 2002).

Una semana después, cuando el ternero se desteta de hembras *Bos indicus*, éstas comienzan a desarrollar ondas foliculares seguido de la ovulación del folículo dominante (Henaó *et. al.*, 2002).

4.3 Antecedentes e importancia de las biotecnologías reproductivas

Investigadores alrededor del mundo han conseguido año tras año avances significativos en los campos ligados al estudio del genoma, la química y la biología molecular, descubriendo así aquellos mecanismos que se ligan íntimamente con la reproducción, el desarrollo embrionario y la manifestación de los genes que modifican el fenotipo y la producción (Rodríguez *et. al.*, 2011).

La mayoría de los productores, profesionales y practicantes de las biotecnologías de la clínica reproductiva están de acuerdo en la aplicación del bienestar animal considerando cada uno de sus requerimientos para manifestar el potencial de los animales y al mismo tiempo preservar la fertilidad y longevidad como reproductores (Rodríguez *et. al.*, 2011); por lo que en la aplicación de las biotecnologías reproductivas deben considerarse puntos de vista éticos y económicos, para no provocar el decremento de la vida útil del animal, ya que en los programas de mejoramiento genético se tiene el control del genoma productivo y su difusión para lograr el incremento en la producción animal y en la calidad de los productos obtenidos de éstos (Ugalde, 2014).

La implementación de biotecnologías reproductivas surge como una opción de mejoramiento genético altamente eficiente pero aún no practicable a nivel de productores comerciales debido a que son costosas (Rodríguez *et. al.*, 2011); estas biotecnologías reproductivas son un conjunto de técnicas que van desde la inseminación artificial hasta la clonación, y todas van encaminadas a lograr un aumento en la eficiencia reproductiva de los animales. Son herramientas útiles que permiten aplicar técnicas incluso más modernas como lo es la transgénesis. La producción de embriones *in vivo* dio paso para producir embriones *in vitro*, y durante su aplicación fueron incorporándose otras herramientas como la inseminación artificial y posteriormente la transferencia de embriones (Ugalde, 2014).

Debido al ritmo de explotación, ha habido una disminución en la variabilidad genética de especies domésticas, lo que pone en peligro de extinción o ya extinguió a algunas razas, por lo que ahora se contempla lograr su resurgimiento por medio de programas de reproducción asistida (Ugalde, 2014).

Las biotecnologías de la reproducción tienen cinco generaciones: en 1908 la inseminación artificial; en 1970 el control hormonal, la transferencia de embriones, la congelación y la división; en 1980 el sexado de embriones y espermatozoides y la producción *in vitro* de embriones; en 1990 la clonación de células somáticas; y en el 2000 la transgénesis (Ugalde, 2014).

Estas generaciones tuvieron un inicio con el objetivo de tener un control sanitario evitando así diseminación de enfermedades, y posteriormente fueron agregándose más objetivos como lo es el aumento de la productividad, el acortamiento del anestro y el reinicio de la actividad ovárica, el desarrollo de programas de estímulo superovulatorio y la transferencia embrionaria (Ugalde, 2014).

Actualmente estas herramientas conocidas como biotecnologías reproductivas son utilizadas alrededor del mundo y con objetivos más específicos que les permiten tener un mejor rendimiento de los animales y de lo que desean obtener de éstos, algunos ejemplos son: Reino Unido, con el objetivo de disminuir la cantidad de grasa de la canal; Francia, cuyo objetivo es aumentar la proteína en la leche; México, con el objetivo de multiplicar animales de alto valor genético; y España, que tiene por objetivo un aumento en la prolificidad (Ugalde, 2014).

4.4 Biotecnologías de la reproducción para mejoramiento genético

4.4.1 Aspiración folicular (OPU) *in vivo* en la vaca

Actualmente, la recuperación de ovocitos de vacas *in vivo* por punción transvaginal guiada a través de un ecógrafo, y su posterior maduración, fecundación y cultivo *in vitro*, permiten la producción de embriones que pueden ser criopreservados por mucho tiempo y ser transferidos a hembras receptoras en el momento en que se decida trabajar (Peláez, 2011).

4.4.1.1 Ventajas y desventajas

Esta técnica permite tomar ovocitos de vacas con una edad de entre 6 y 8 meses, durante el primer tercio de la gestación y a partir de las 2 o 3 semanas posteriores al parto, por lo que no afecta los ciclos productivos o reproductivos de las hembras donantes (Peláez, 2011).

La recolección de ovocitos de hembras vivas permite incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora al año a través de

procedimientos *in vitro*, además de que disminuye el intervalo generacional y ayuda a establecer esquemas para incrementar la eficiencia productiva (Peláez, 2011).

La aspiración folicular puede ser repetida en la misma hembra durante 5 o 6 meses y con una periodicidad de 2 o 1 aspiración por semana sin provocar efectos negativos sobre su reproducción o su bienestar animal (Peláez, 2011).

También, puede ser aplicada durante los primeros 3 meses de gravidez a novillas o vacas con lo que se logra hacer más corto el intervalo generacional (Peláez, 2011).

Y además, en conjunto con la fecundación *in vitro* permite obtener embriones de hembras con problemas de infertilidad o mala respuesta a los tratamientos superovulatorios (Peláez, 2011).

4.4.1.2 Resultados esperados

Cuando se realiza la aspiración folicular sin apoyo de un ultrasonido y utilizando únicamente la palpación rectal, se obtiene un promedio de 6 ovocitos por donadora (Caicedo, 2008).

Con apoyo del ultrasonido, en razas *Bos indicus* se obtienen en promedio entre 37 y 39 ovocitos por aspiración folicular, siendo la raza Nelore en la que hay mayor recuperación en donde se pueden obtener hasta 54 ovocitos por aspiración. El número más bajo de ovocitos recuperados en *Bos indicus* es de 18 por aspiración (Amilcar, 2015).

La viabilidad de los embriones producidos a partir de la aspiración folicular *in vivo* es similar a viabilidad de los embriones obtenidos de ovocitos con la aspiración folicular *in vitro*, pero es un poco más baja que la viabilidad obtenida para embriones obtenidos por lavado; con esta técnica se obtienen porcentajes de preñez que tienen un rango de 25-45% (Peláez, 2011).

4.4.1.3 Descripción de la técnica de la OPU

Antes de la realización de la OPU es indispensable disponer de los tres componentes más importantes: el equipo de ultrasonido o ecógrafo con su respectivo transductor, la bomba de aspiración y un sistema de guía de aguja conectado a un tubo colector (Figura 12) (Denis, 2008).

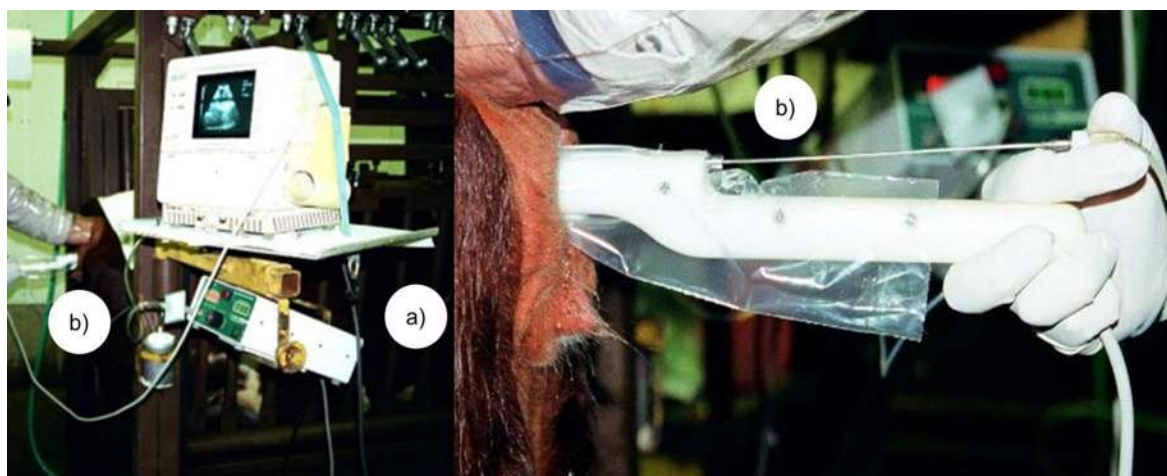


Figura 12. Equipo para realizar la OPU; a) ultrasonido con transductor y bomba de aspiración, b) sistema de guía de aguja conectado a un tubo colector (Córdoba, 2009).

Para realizar esta técnica, el transductor o sonda es colocado en un soporte rígido de 50 cm, el cual contiene la guía de la aguja de punción. Las agujas son introducidas a través de una guía adaptada a la parte plástica o metálica que sujeta el transductor, y

con una bomba de vacío se realiza la presión de aspiración necesaria para recolectar el contenido de los folículos puncionados utilizando presiones de entre 50 y 85 mm de Hg (Denis, 2008).

Existen 3 tipos de agujas que pueden utilizarse para realizar la aspiración folicular: agujas largas, las cuales tienen una medida de 35 a 60 cm y son de uso único, pero tienen el inconveniente de que pierden filo con facilidad por lo que se recomienda cambiarlas entre vaca y vaca, además de que son costosas; agujas cortas, las cuales son desechables pero son más económicas que las largas; y las agujas de bisel, las cuales son cortas y suelen ser más eficaces ya que la tasa de recolección de ovocitos es mayor y el daño a las células del *cumulus* es mucho menor; también, existe un sistema semi-desechable en el cual se cambia la punta de las agujas largas por agujas cortas desechables, pero daña la calidad de los ovocitos debido a la toxicidad de los fundentes utilizados y la longitud metálica por donde deben transitar al ser aspirados (Denis, 2008).

Antes de comenzar la punción, algunos operadores prefieren sedar a las hembras con hidrocloreto de detomidina (Domocedan) vía endovenosa, a razón de 1 mg/100 kg de peso vivo y/o hiosina-N-butilbromida (Buscopan) como relajante intestinal antes de aplicar la anestesia epidural (Denis, 2008).

Posteriormente, se procede a extraer las heces del recto para continuar con la limpieza, desinfección y secado de la vulva y la región perineal con agua, desinfectante y papel higiénico (Denis, 2008).

Después, cuando la aguja ya está colocada en la guía del transductor se introduce a través de la vagina, y la mano que le queda libre al operador la introduce por el recto

para poder localizar, a la izquierda o a la derecha del cérvix, el ovario seleccionado para acercarlo al transductor y puncionarlo (Figura 13) (Denis, 2008).

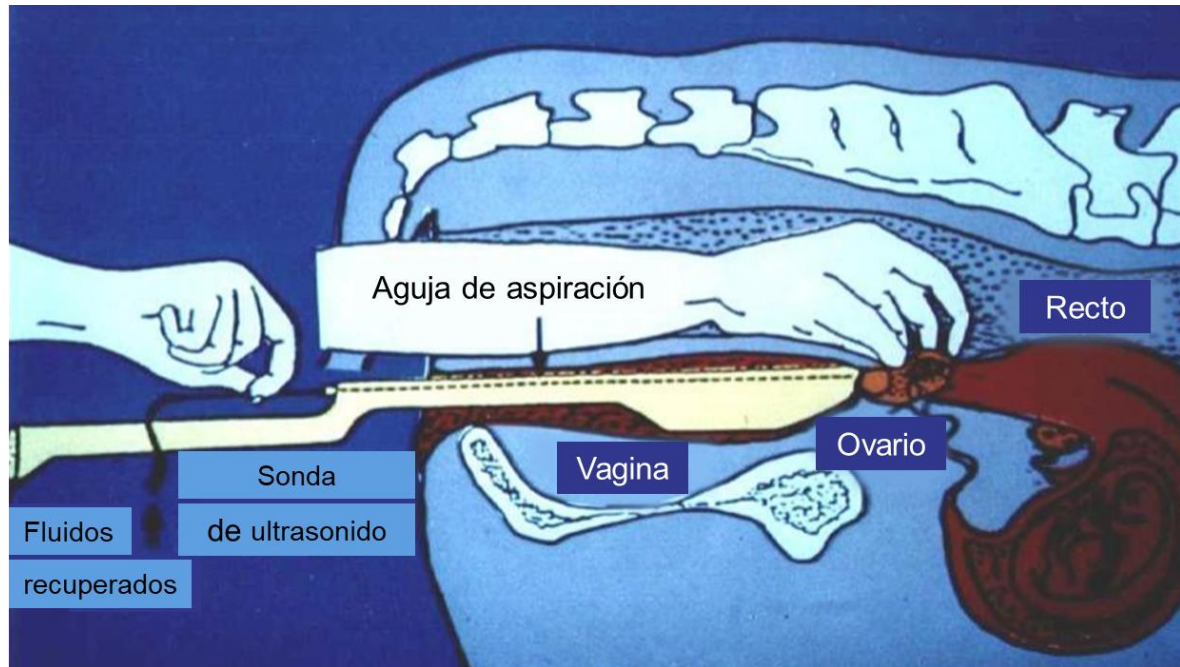


Figura 13. Recolección de ovocitos (Córdoba, 2009).

Los folículos se observan como imágenes anecogénicas, es decir, de color negro, en el ovario; es necesario lograr que coincidan los ovarios con la línea discontinua que aparece en la pantalla del ecógrafo y que marca el recorrido de la aguja (Figura 14). Y esto se logra manipulando el ovario para posteriormente iniciar la presión negativa y hacer avanzar la aguja; y después es posible en ese momento visualizar en la pantalla del ecógrafo la aspiración del folículo (Denis, 2008).

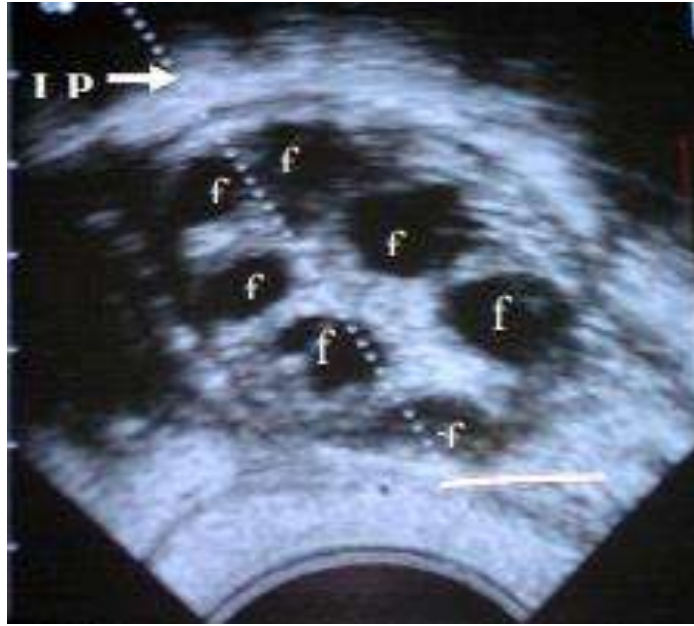


Figura 14. Imágenes de ovario con folículos (f) y línea de punción (LP) que marca el recorrido de la aguja (Denis, 2008).

El manejo de la aguja puede realizarlo el propio operador, aunque a veces por la incomodidad al manipular tanto el ovario como la aguja pueden recibir ayuda de otro operador para realizar un trabajo con mayor eficiencia (Denis, 2008).

Es importante destacar que antes de iniciar la operación, la aguja debe pasar por una solución fosfatada buferada (PBS) a la cual se le adiciona 0.4% de suero de albúmina bovina (SAB) o 1% de suero fetal (SFV) y 10 UI/ml de heparina sódica, o bien, solamente por la heparina sódica, para evitar la coagulación de la sangre, la cual llega a ser bastante cuando los ovocitos pasan al tubo de recolección (Denis, 2008).

4.4.1.4 Colecta y transporte de los ovocitos

El contenido de la punción cae directo a un filtro o a un tubo recolector, el cual debe mantenerse alrededor de los 37°C hasta el momento en que se procede a buscar y clasificar los ovocitos colectados (Denis, 2008).

El diámetro del filtro por donde pasan los ovocitos después de la punción, no debe ser mayor a 100 μm ; posteriormente, este contenido se lava con PBS y puede adicionarse 0.4% de SAB y 10 UI/ml de heparina sódica, todo el proceso a una temperatura de 37°C, para eliminar la sangre y realizar así más fácil la búsqueda y la clasificación morfológica de los ovocitos en un microscopio estereoscópico (Denis, 2008).

4.4.1.5 Clasificación de los ovocitos

Los aspectos más considerados al momento de clasificar la calidad de los ovocitos colectados son la morfología de las células del *cumulus* y el aspecto microscópico del citoplasma, ya que la relación que existe entre ambas características intervienen en el posterior desarrollo embrionario cuando se realiza la fecundación *in vitro* (Denis, 2008).

Otra característica considerada para realizar la clasificación es la talla del ovocito, ya que ovocitos con un diámetro menor a 110 μm tienen una maduración nuclear y/o citoplasmática incompleta al momento de la fecundación, y el número de blastocistos que se logra con ellos es muy inferior a los que se consiguen con ovocitos mayores a 100 μm de diámetro (Denis, 2008).

También, pueden ser clasificados de acuerdo al número de las capas de células del *cumulus*, la homogeneidad y apariencia del citoplasma. Para estas características, existen 2 clasificaciones (Rafagnin *et. al.*, 2011; Martínez, 2013).

La primera, es la clasificación 2, 3 y 4 categorías, la cual, es una clasificación en donde el tipo A corresponde a un ovocito con hasta 4 capas de células del *cumulus*, compactas, con citoplasma homogéneo y transparente; el tipo B corresponde a una clasificación que va de 1 a 3 capas múltiples del *cumulus*, con un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras; el tipo C es una clasificación para ovocitos con *cumulus* desnudo y un citoplasma irregular con zonas oscuras; y el tipo D corresponde a ovocitos con células expandidas en el *cumulus* y un citoplasma irregular con zonas oscuras (Martínez, 2013).

La segunda clasificación, corresponde a catalogar los ovocitos colectados en 5 categorías (Figura 15). La primera, corresponde a GI, en donde el *cumulus* se encuentra compacto con más de 3 capas de células, y el ovoplasma se halla con granulaciones finas y homogéneas que llenan el interior de la zona pelúcida y la capa de color oscuro. La segunda, corresponde a GII, en donde el *cumulus* se encuentra compacto rodeando completamente al ovocito con menos de 3 capas celulares, y el ovoplasma se encuentra con granulaciones distribuidas de manera heterogénea que pueden estar más concentradas al centro y más claro en la periferia o condensadas en un solo lugar en donde logra apreciarse una mancha oscura. La tercera categoría pertenece a GIII, en el cual el ovoplasma se encuentra contraído, con espacio entre la membrana celular y la zona pelúcida, llenando el espacio perivitelino de manera irregular. La cuarta, corresponde a ovocitos desnudos, los cuales no están completamente cubiertos por las células del *cumulus* o simplemente hay ausencia de éstas. Y la quinta, es en donde hay atresia debido a que el *cumulus* se encuentra con signos de degeneración citoplasmática (Rafagnin *et. al.*, 2011).

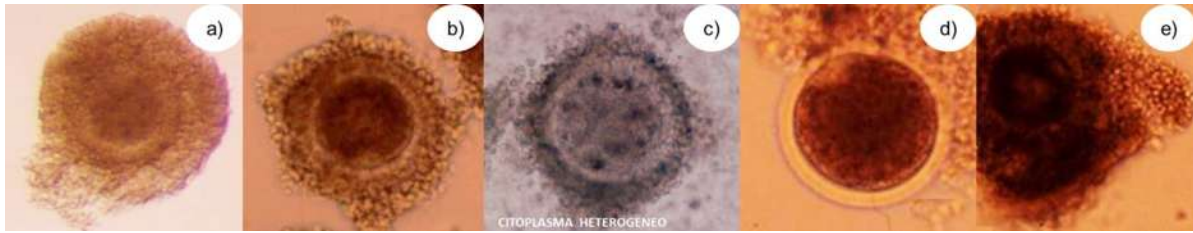


Figura 15. Clasificación de los ovocitos en a) G1, b) GII, c) GIII, d) Desnudos, e) Atrésicos (Rivera, 2019).

4.4.1.6 Selección de los ovocitos

Además de la expansión de las células del *cumulus*, otro principal indicador para seleccionar ovocitos maduros, es la presencia de un citoplasma homogéneo y un corpúsculo polar recientemente extruido. Esta última característica es un indicativo de la detección del gameto femenino en metafase II de la meiosis. La extrusión del corpúsculo polar en los bovinos comienza a partir de las 16 horas de iniciada la maduración *in vitro* alcanzando su nivel máximo entre las 22 y 24 horas (Martínez, 2013).

En la clasificación presentada por Rafagnin *et. al.*, (2011) se consideran viables los ovocitos de las categorías G1, GII y GIII, debido a que al estar rodeados por varias capas de células del *cumulus* presentan porcentajes altos de maduración, fecundación y desarrollo hasta blastocistos, por lo que ovocitos G1 son los mejores, aunque GII y GIII también son aceptables con buenas tasas de viabilidad aunque a un grado menor que G1.

4.4.1.7 Transporte de los ovocitos

Un método efectivo para transportar a los ovocitos, es colocarlos en tubos de microcentrífuga (Eppendorf) con un medio de transporte para maduración *in vitro* con

TCM-199 (Invitrogen 11150-059), 5 ug/ml de FSH altamente purificada (pFSH) (Follitropin, Bioniche), 50 g/ml de gentamicina (Sigma), 25 milimolares hepes (Sigma) y 10% de suero fetal bovino (Gibco), y posteriormente introducirlos a una transportadora que debe tener la misma temperatura con la que han sido tratados los ovocitos desde su aspiración (Konrad *et. al.*, 2013).

El transporte no debe exceder 20 horas, ya que en un lapso de hasta 24 horas los ovocitos pierden su viabilidad para poder ser fecundados (Konrad *et. al.*, 2013).

4.4.1.8 Componentes de los medios de cultivo

Los ovocitos seleccionados son lavados de 2 a 3 veces en cajas de Petri pequeñas con medio m-PBS. Y después, se utilizan los medios de cultivo para el desarrollo, en donde los más utilizados son el CR1aa, el cual contiene iones, azúcares y aminoácidos; y el TCM-199, el cual contiene aminoácidos, sales inorgánicas, glucosa y vitaminas; los componentes de ambos medios de cultivo permiten la maduración de los ovocitos simulando el ambiente uterino y oviductal (Filipiak y Larocca, 2010).

Para el cultivo ya sea con CR1aa o TMC-199, es necesario realizarlo con células de la granulosa, en donde en una caja de Petri se coloca el medio de cultivo cubierto con aceite mineral y se cultivan las células de la granulosa en una estufa a la temperatura con la que se han manejado los ovocitos desde la aspiración folicular con 5% de CO₂, 95% de oxígeno, humedad de 100%, un pH constante de entre 7.2 y 7.4, y una osmolaridad de entre 275 y 285 mOsm (Filipiak y Larocca, 2010).

Una alternativa para estos medios de cultivo es el uso de suero de vaca en celo (SVC) y/o licor folicular bovino (LFb), los cuales son componentes biológicos más económicos. Cuando se utiliza un medio de cultivo como LFb se obtienen resultados

favorables en la maduración y/o desarrollo de los folículos, ya que es rico en esteroides, glucosaminoglicanos y otros metabolitos sintetizados por las células de la teca folicular. Los medios de cultivo pueden complementarse de manera estandarizada con antibióticos para suprimir crecimiento de agentes contaminantes (Filipiak y Larocca, 2010).

4.4.1.9 Factores que intervienen en la eficiencia de la OPU

La aspiración folicular es una técnica reciente, y presenta un amplio rango en cuanto a la cantidad de ovocitos que pueden obtenerse de las vacas, la cantidad de ovocitos viables, la producción de blastocistos y la tasa de gestación (Caicedo, 2008).

Las variaciones de los resultados que puedan obtenerse pueden deberse a factores propios del animal como la genética o la raza; y a factores ajenos al animal como lo son el manejo y la técnica de aspiración (Caicedo, 2008).

4.4.1.9.1 Donadoras

La variabilidad entre las donadoras de ovocitos tiene un rango amplio, debido a que cada hembra responde diferente a la aspiración folicular, aunque el porcentaje de viabilidad de los ovocitos no tiene un rango amplio como lo es su recuperación del ovario (Caicedo, 2008).

Pero hay dos posibles explicaciones para esto; la primera es que siempre hay un constante reclutamiento de nuevos folículos cuando los presentes son aspirados, y la velocidad del reclutamiento folicular es diferente en cada hembra; y la segunda es que

puede haber presencia de CL, lo que puede interferir en el número de ovocitos aspirados (Caicedo, 2008).

4.4.1.9.2 Razas

El número medio de ovocitos recolectados es diferente entre las donadoras bovinas *Bos indicus* y *Bos taurus*, siendo superior el número de ovocitos recolectados en bovinas *Bos indicus* (Caicedo, 2008).

En razas *Bos indicus* el porcentaje de ovocitos recuperados que cumplen con las características para ser fecundados (ovocitos viables) es de 66%, mientras que en razas *Bos taurus* es del aproximadamente 50% (Báez *et. al.*, 2010).

4.4.1.9.3 Frecuencia y momento de la aspiración relativos al momento del ciclo estral

La tasa de recuperación de ovocitos inmaduros aumenta si la colecta es repetida en la misma vaca durante un lapso de varios meses. La aspiración cuando es repetida 2 veces por semana produce un aumento considerable en el número de folículos visibles y los ovocitos recuperados (Caicedo, 2008).

Sin embargo, los mejores resultados se obtienen con el primer procedimiento de OPU y teniendo intervalos de 60 días entre una aspiración y otra, aunque la OPU semanal o quincenal de igual manera mantiene buen promedio de recuperación de ovocitos viables (Caicedo, 2008).

4.4.1.9.4 Variaciones entre los operadores

Las técnicas empleadas por el operador determinan grandes variaciones en el número de folículos aspirados y el número de ovocitos recuperados en el laboratorio. Con los sucesivos cambios de equipo y también las diferencias entre las vacas donadoras, está demostrado que las variaciones más importantes en los resultados obtenidos con la OPU, están determinadas principalmente por las hembras donadoras y posteriormente por el operador (Caicedo, 2008).

Azambuja *et. al.* (1997) demostraron que después de un arduo entrenamiento de 90 días, un técnico sin experiencia obtiene una mejoría del 91% en la recuperación de ovocitos.

4.4.2 Fertilización *in vitro* de los ovocitos (FIV)

Antes de llevar a cabo la FIV, primero, los espermatozoides deben ser previamente capacitados. La capacitación espermática es el momento donde son retiradas las glucoproteínas de la membrana del espermatozoide para así permitirle adquirir su capacidad para fecundar al ovocito (Filipiak y Larocca, 2010).

Posteriormente, se deben procesar los ovocitos ya madurados para poder realizar la fecundación (Filipiak y Larocca, 2010).

4.4.2.1 Ventajas y desventajas

La FIV es una biotecnología reproductiva cuyo objetivo principal es aprovechar al máximo el genoma de los donadores para multiplicar a aquellos animales cuyo valor genético es elevado (Peláez, 2011).

Es una herramienta con la que se puede realizar una evaluación eficiente de la capacidad fertilizante de espermatozoides y ovocitos; permite la difusión del semen valioso y escaso; se prolonga la vida reproductiva de los animales genéticamente valiosos, inmaduros o muy viejos, ya que sólo se utilizan como donadores y no como vientres; permite determinar y seleccionar el sexo de los embriones; y también, con esta biotecnología se pueden obtener descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por enfermedad, infertilidad o edad avanzada (Peláez, 2011).

Una de sus principales características es que hay un mayor control de enfermedades en la esfera reproductiva, ya que todo el material genético debe ser analizado y procesado para poder realizar la FIV; y también tiene algunos inconvenientes, como el bajo rendimiento y porcentaje de los ovocitos capaces de transformarse en embriones transferibles, ya que el resultado se encuentra estancado entre el 30 y 40%, por lo tanto, muchos productores no lo ven como buena inversión, ya que también consideran bastante el hecho de que es una biotecnología costosa; pero una desventaja todavía más importante gira alrededor de la criopreservación ya que ésta se dificulta a largo plazo provocando así un incremento en la muerte embrionaria (Peláez, 2011).

4.4.2.2 Resultados esperados

Cuando se realiza la maduración de los ovocitos *in vitro*, alrededor del 90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar alcanzan a realizar el proceso de metafase II y expulsan el primer corpúsculo polar. De estos ovocitos, aproximadamente el 80% son

fecundados y posteriormente comienzan a dividirse por lo menos hasta el estadio de 2 a 4 células, pero solamente del 25 al 40% de los ovocitos alcanzan el estadio de blastocisto o blastocisto expandido (Peláez, 2011).

Cuando se llega a obtener una calidad del 40.6% en los ovocitos, se espera que éstos tengan por lo menos una fertilidad del 22.4%; y ovocitos con una calidad de 46.7% se espera que lleguen a tener una fertilidad del 30.2% (Martínez, 2013).

4.4.2.3 Descripción de la técnica de la FIV

Primero, se preparan los complejos *cumulus* de los ovocitos (COCs), los cuales se lavan utilizando la solución BO 2 o 3 veces y después se dejan en gotas de BO en estufa utilizando la temperatura constante que han tenido los ovocitos desde la aspiración folicular y con 5% de CO₂ por 24 horas (Figura 16) (Filipiak y Larocca, 2010).



Figura 16. Cultivo en la estufa (Peláez, 2011).

Y posteriormente, en lo que se preparan los COCs, se procede a preparar el semen para capacitarlo (Filipiak y Larocca, 2010).

Primero, se coloca en una platina a 35°C un tubo cónico de centrífuga y portaobjetos estériles para que templen; luego se saca la pajilla con el semen del termo con nitrógeno y se mantiene a temperatura ambiente durante 10 segundos para en seguida colocarla a Baño maría a 35°C por 30 segundos (Figura 17); después se seca con una gasa húmeda con alcohol y se retira el tapón con una tijera para colocarla invertida sobre el tubo de centrífuga de manera inclinada y cortar el otro extremo para permitir que el semen comience a descender por la pared del tubo; ahora, el semen en el nuevo tubo se coloca en Baño maría a 35°C; con el portaobjetos ya caliente, se retira una gota de la pajilla; y al tubo con el semen se le agrega 6 ml de medio de lavado para semen y se centrifuga a 2,000 rpm durante 5 minutos (Filipiak y Larocca, 2010).



Figura 17. Baño maría utilizado para descongelar el semen (Peláez, 2011).

Mientras tanto, la gota que se retiró con el portaobjetos, debe ser observada en el microscopio a un aumento recomendado de 10 del objetivo y 40 del ocular para evaluar vitalidad, motilidad y concentración (Figura 18) (Filipiak y Larocca, 2010).



Figura 18. Evaluación de la vitalidad y motilidad de los espermatozoides, y cámara de Neubauer para conteo de espermatozoides (Peláez, 2011).

Cuando el tubo es retirado de la centrífuga, se aspira el líquido sobrante, y el pellet que queda en el fondo del tubo se diluye en 6 ml de medio de lavado para semen, y se repite el procedimiento en la centrífuga a 2,000 rpm por 5 minutos. Cuando culmina el tiempo en la centrífuga, se vuelve a aspirar el líquido sobrante del tubo, y posteriormente, el pellet que queda en el fondo se diluye enrazando el volumen final (Filipiak y Larocca, 2010).

Una vez madurados los COCs, se procede a lavarlos y posteriormente se colocan en gotas de inseminación que contengan la concentración de espermatozoides por ml deseada. La relación que se utiliza es de 10 COCs/100 μ l de medio de fecundación (Filipiak y Larocca, 2010).

El medio utilizado para fecundar se conoce como medio Brackett and Oliphant, el cual tiene un contenido rico en heparina y cafeína, los cuales son componentes necesarios para la capacitación espermática (Filipiak y Larocca, 2010).

Para comenzar con la inseminación, se prepara una caja de Petri y el semen ya capacitado y diluido a la concentración deseada; después se preparan gotas para la

inseminación cubiertas con aceite mineral; se sacan los ovocitos del medio BO y se colocan por grupos en las gotas de semen, en una proporción de 10 ovocitos en 100 μ l aproximadamente (Figura 19) (Filipiak y Larocca, 2010).

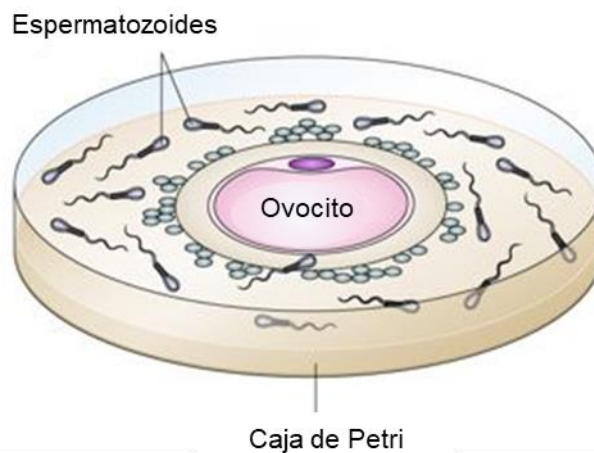


Figura 19. FIV convencional (Silber *et. al.*, 1994).

Posteriormente, se coloca la caja con los ovocitos y el semen en la estufa para incubar por 24 horas. Y finalmente, después de la inseminación, se prepara un medio de desarrollo que consiste en CR1aa o TCM-199 en la estufa con aceite mineral, con 5% de CO₂, temperatura constante y un pH de entre 7.2 y 7.4 (Filipiak y Larocca, 2010).

4.4.2.4 Factores que intervienen en la eficiencia de la FIV

Uno de los principales factores que intervienen en la fecundación del ovocito, es la morfología de éste, debido a que sus características morfológicas puede inhibir o permitir el desarrollo del embrión; pero, de manera general, las principales características que se consideran del ovocito para que pueda desarrollarse son las blastómeras en la masa interna, la estructura de la zona pelúcida y la velocidad con la que pueda lograr el desarrollo embrionario. También, existen diferencias funcionales como las anomalías que pueden haber en las uniones intercelulares, las

alteraciones de la apoptosis, las alteraciones genéticas y las alteraciones cromosómicas (Martínez, 2013).

Otros factores que influyen en la fertilidad del ovocitos son factores externos, como la calidad del semen, la técnica de manejo del ovocito y el ambiente en el que se desarrolla (Martínez, 2013).

4.4.2.4.1 Temperatura y tiempo en el transporte de los ovocitos

Los ovocitos destinados para FIV, deben ser transportados adecuadamente, con una temperatura constante, y deben ser fecundados antes de 20 o 24 horas posteriores a su obtención por OPU debido a que pierden su viabilidad (Konrad *et. al.*, 2013).

4.4.2.4.2 Selección de los ovocitos

Deben seleccionarse solamente aquellos ovocitos con clasificación A o B; o GI, GII o GIII (de acuerdo a la clasificación consultada), debido a que la calidad de éstos varía en promedio entre 30 y 40%, la cual dará la fertilidad más alta (Rafagnin, 2011; Martínez, 2013).

4.4.2.4.3 Toros

El uso de semen congelado de diferentes toros juega un papel importante en el resultado final del proceso entre la aspiración folicular y la fecundación *in vitro*, ya que la tasa de fertilidad de los toros puede cambiar tanto en campo al momento de hacer

extracción del semen como en laboratorio al momento de procesar el semen y posteriormente realizar la fecundación *in vitro* (Caicedo, 2008).

En promedio, de acuerdo a la calidad del semen, el porcentaje de embriones producidos tiene un rango muy amplio que va desde el 9 hasta el 50%; pero se presentan casos excepcionales, como en el caso de la raza *Bos indicus* Nelore ya que ésta alcanza un porcentaje de desarrollo embrionario desde 38 hasta 91% (Kruip *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1998).

También, hay otro factor que interviene en el resultado del porcentaje de fecundación de los ovocitos, éste es la interacción entre el toro y las diferentes técnicas de extracción del semen (Dayan *et al.*, 2000).

Por lo tanto, es recomendable aplicar pruebas para evaluar diferentes lotes de semen, ya que los resultados de éstas pueden mostrar diferencias radicales entre la calidad de los ovocitos de la donadoras y el semen utilizado para la producción de embriones (Suavé, 1998).

4.4.2.4.4 Preparación espermática para la FIV

El primer paso para la FIV, es la preparación del semen, en donde se deben separar los espermatozoides vivo de los componentes seminales y los crioprotectores. Y las técnicas más utilizadas para lograr este procedimiento son Swim Up y Gradientes de Percoll (Gonella *et al.*, 2013).

El proceso de la separación de espermatozoides vivos debe ser un proceso simple, rápido y económico, en donde se puedan procesar grandes volúmenes de semen,

controlar la concentración y el volumen final de la suspensión espermática y evitar alteraciones espermáticas durante el procesamiento para poder recuperar la mayoría de los espermatozoides motiles (Gonella *et. al.*, 2013).

Swim Up consiste en separar espermatozoides vivos de espermatozoides muertos, del plasma seminal y de los componentes diluyentes (Figura 20). Para llevar a cabo este proceso, se depositan de 200 a 500 μ l de semen en el fondo de tubos con entre 1 y 2 ml de medio sperm-talp, para que el semen se mantenga al fondo del tubo. Después, estos tubos son incubados en un ambiente de 5% de CO₂ y a una temperatura entre 39 y 45°C durante una hora, permitiendo así, a los espermatozoides migrar hacia la posición superior del medio para que se separen del resto de los componentes seminales. Posteriormente, el sobrante es aspirado para no permitir que los componentes del fondo del tubo entren en contacto con los espermatozoides, y esta porción se centrifuga con 4 ml de medio sperm-talp para después volver a centrifugar y finalmente obtener de 1 a 2 x 10 espermatozoides/ml (Gonella *et. al.*, 2013).



Figura 20. Técnica de Swim Up (Peláez, 2011).

La técnica Percoll consiste en centrifugar el semen pasándolo por diferentes gradientes de concentración para así permitir la separación de los espermatozoides vivos de los espermatozoides muertos y de los componentes del semen, utilizando

como base la diferencia de las densidades (Figura 21). Para la dilución, el medio sperm-talp debe tener sus sales concentradas en una proporción de 10 veces. Con este medio, se prepara la solución de Percoll al 90% y después se realiza una segunda dilución de Percoll a 45%. En el fondo del tubo se debe colocar primero la solución de Percoll al 90% y luego, poco a poco, se coloca la misma cantidad de Percoll al 45%, sin permitir que ambas soluciones se mezclen. El contenido de la pajilla del semen se deposita en la superficie para posteriormente someterse a centrifugación por 30 minutos. Cuando la centrifugación termina, el pellet resultante es el que contiene a los espermatozoides vivos, y lo demás es descartado (Gonella *et. al.*, 2013).

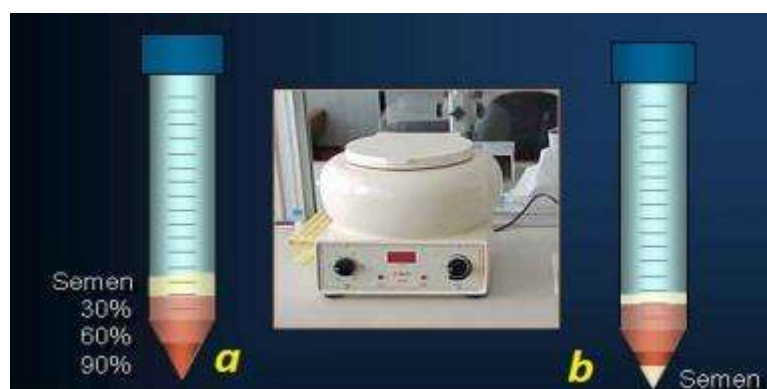


Figura 21. Técnica de centrifugación en Percoll (Peláez, 2011).

4.4.2.5 Desarrollo *in vitro*

Una vez que finaliza la etapa de la inseminación, se remueven los *cumulus* de los ovocitos y se lavan con el medio para el cultivo CR1aa; después se incluyen con el medio de cultivo en gotas cubiertas de aceite mineral y se colocan en la estufa (Filipiak y Larocca, 2010).

Para realizar la remoción de los *cumulus*, se forma una gota de 300 µl del medio TCM-199 con Hepes suplementado con 5% de SEb en una caja pequeña y se pipetea 40 veces con una micropipeta automática de 100 µl (Filipiak y Larocca, 2010).

Después, los ovocitos son lavados con el medio de cultivo CR1aa dos veces y se pasan a las gotas de cultivo. Posteriormente, se coloca una caja de Petri en la incubadora a una temperatura constante con 5% de CO₂ (Filipiak y Larocca, 2010).

Luego de 48 o 72 horas, se debe realizar la primera evaluación de la división celular. Posteriormente, esto mismo debe realizarse cada 48 horas por 10 días, en los cuales los ovocitos fecundados ya deberán encontrarse en estado de blastocisto y/o blastocisto expandido (Figura 22) (Filipiak y Larocca, 2010).

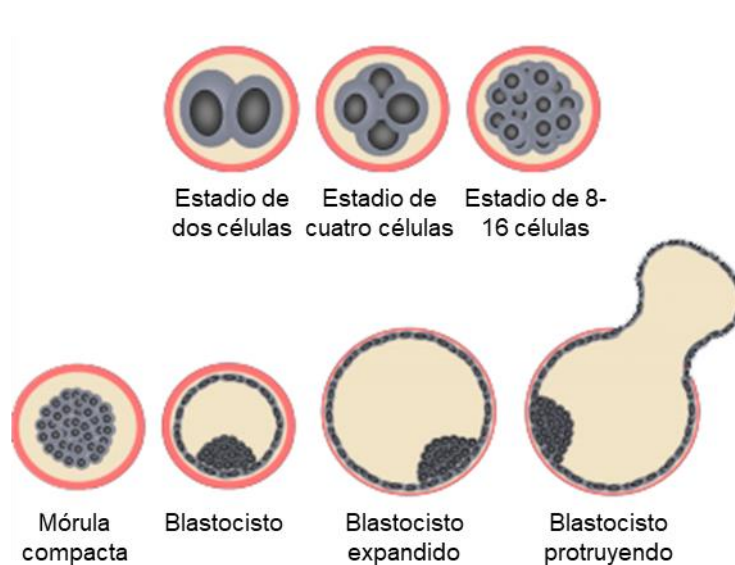


Figura 22. Estadios embrionarios en periodo de cultivo (Peláez, 2011).

4.4.2.6 Mantenimiento de los embriones

Una manera de suplementar fuente de proteínas a los embriones *in vitro*, es mediante la adición de suero fetal bovino (SEb) o de albúmina de suero bovino (BSA). El SEb y la BSA afectan el pH del medio y actúan como quelantes de iones metálicos, y contienen factores de crecimiento y ciertas cantidades variables de hormonas que inciden en la diferenciación y proliferación celular. El pH de los embriones debe mantenerse entre 7.6 y 7.8 (Filipiak y Larocca, 2010).

4.4.3 Criopreservación de los embriones

Con la aplicación y el desarrollo de biotecnologías de la reproducción, se ha logrado un avance importante para la obtención de un mayor número de embriones que pueden ser obtenidos de una sola hembra donadora cuyo valor genético es alto, y además permite salvar las limitantes de esta especie, maximizando sus capacidades gaméticas (Guerra *et. al.*, 2012).

El uso del semen congelado de diferentes toros, es un factor importante para determinar el resultado final del proceso entre la OPU y la FIV. Esto quiere decir que la fertilidad de los toros es variable tanto en campo, es decir, cuando se realiza la extracción del semen, como en el laboratorio cuando el semen se procesa (Caicedo, 2008).

Kruip *et. al.* (1994) reportaron que una vaca de aproximadamente 12 años de edad se apareó con 8 toros diferentes, de los cuales solamente se obtuvieron embriones con 4 de estos toros, y de estos embriones entre el 9 y 19% lograron desarrollarse a término.

Watanabe *et. al.* (1998) obtuvieron variaciones entre el 38 y el 91% en las divisiones del desarrollo embrionario, y el 16 y 50% en la producción de embriones, con 12 reproductores de la raza Nelore.

Dayan *et. al.* (2000) encontraron que, además de la variación del toro, hay también un efecto resultante de la interacción entre el toro y la vaca, aun cuando un mismo toro presentó variaciones en la producción de embriones y gestaciones, a cuando fue usado con vacas diferentes.

Suavé (1998) sugiere la aplicación de una prueba para evaluar cada uno de los diferentes lotes de semen de los toros utilizados, ya que los resultados mostraron grandes diferencias entre los animales y entre los lotes.

También, surgió la necesidad de encontrar técnicas que permitieran preservar embriones por un tiempo más prolongado que el que se acostumbra en programas de transferencia inmediata, y la alternativa más estudiada y aplicada en este sentido es la criopreservación de los embriones, la cual ha permitido que el material biológico de diversas especies animales sea almacenado indefinidamente sin pérdida funcional de la actividad y las funciones genéticas (Guerra *et. al.*, 2012).

Dentro de las diferentes técnicas de criopreservación desarrolladas destacan la congelación lenta (Figura 23) y la vitrificación (Figura 24), las cuales, son técnicas que permiten la conservación de este material por tiempo prolongado, el cual puede ser desde algunos meses hasta años; incluso se plantea la idea de que en un futuro se puedan mantener viables embriones a temperaturas de -196°C en nitrógeno líquido durante posiblemente 1000 años o más (Guerra *et. al.*, 2012).



Figura 23. Congelador para congelación lenta (SERIDA, 2011).



Figura 24. Vitrificación de embriones (SERIDA, 2011).

La congelación lenta consiste en exponer a los embriones a una solución de 1.5 ml de etilenglicol durante 10 minutos; después son envasados en pajillas de 0.25 ml para ser colocadas en un equipo de congelación especial para embriones, como lo puede ser el modelo CL 2000 Standard System de la marca CRYOLOGIC, a -7°C por 10 minutos; la formación de cristales o seeding se induce 2 minutos después; posteriormente, los embriones son llevados a una segunda fase de enfriamiento a una tasa de 0.5°C/minuto hasta los -32°C; y finalmente, se sumergen en nitrógeno líquido. Para llevar a cabo la descongelación, se exponen las pajillas a temperatura ambiente por 10 segundos para luego sumergirlas en agua a 37°C por 10 segundos más; y finalmente son colocados en 2 ml de medio de mantenimiento (PBS + BSA) en una placa de Petri para su evaluación morfológica y posterior puesta en cultivo (Guerra *et. al.*, 2012).

Para la vitrificación existen dos protocolos. El primer protocolo consiste en colocar a los embriones en una solución al 6.5 ml de glicerol más 6% de suero fetal bovino en PBS, y embalados en pajuelas de 0.25 cc, este procedimiento debe realizarse en 2 minutos; y después, los embriones son sumergidos en nitrógeno líquido. El segundo protocolo consiste en crear una solución crioprotectora con 25% de glicerol, más 25% de etilenglicol en PBS, durante 2 minutos en un solo paso; después esta solución junto con los embriones se coloca en pajuelas de 0.25 cc, y después se sumergen en nitrógeno líquido (Guerra *et. al.*, 2012).

La descongelación en ambos protocolos es la misma, en donde las pajuelas se sumergen en agua a 30°C por 30 segundos. En ambos protocolos, la extracción del crioprotector se puede llevar a cabo en una solución de 0.5 ml de sucrosa más 1% de suero fetal bovino durante 5 minutos; después de realizada la descongelación, los embriones se trasladan a un medio TCM-199 para su cultivo y para su evaluación en el desarrollo y eclosión durante 72 horas (Guerra *et. al.*, 2012).

La vitrificación se considera superior a la congelación lenta, ya que no genera cristales de hielo intracelular pero produce niveles de gestación sólo 10% inferiores a los de embriones frescos (Naranjo *et. al.*, 2016).

La criopreservación es un procedimiento fiable en embriones producidos *in vivo*, aunque requiere de mejoras para embriones *in vitro* (Naranjo *et. al.*, 2016).

4.4.4 Transferencia de embriones (TE)

La transferencia de embriones consiste en extraer embriones ya sean no implantados en el conducto reproductor de la madre donante (madre genética) por perfusión con un medio apropiado o embriones creados a partir de FIV, para luego depositarlos en el conducto de una hembra receptora (madre nutricia) de la misma especie, donde se obtiene la gestación a término (Betancourth y Cáceres, 2011).

4.4.4.1 Ventajas y desventajas

Es una biotecnología reproductiva que tiene una gran cantidad de ventajas, entre las que destacan: acelerar el progreso genético; aprovechamiento máximo del potencial de hembras de alta genética; control de enfermedades; acortamiento del intervalo generacional; aumento de la natalidad por partos dobles; conservación de especies en extinción; formación de nuevas razas con pocos donantes; producción de gemelos o cuatrillizos; control del género de las crías; y la obtención de crías con mayor posibilidad de supervivencia y adaptación (Betancourth y Cáceres, 2011).

Pero también, tiene una lista de inconvenientes que, aunque son pocos y no son graves, se deben considerar para llevar a cabo el proceso de transferencia de

embriones, los cuales son: posible multiplicación de características indeseables de animales que no son aptos para ser introducidos en un programa de TE; poca disponibilidad de hembras receptoras ideales; altos costos en materia de hormonas para control del ciclo estral y superovulación; se necesita personal técnico altamente capacitado para evitar disminuciones en la efectividad de la técnica; y la variabilidad en cuanto a la calidad de los embriones (Betancourth y Cáceres, 2011).

4.4.4.2 Resultados esperados

La tasa de preñez utilizando embriones transferidos en fresco, depende de la época del año en el que se realiza, pero ésta no varía mucho; las tasas obtenidas en las 4 estaciones del año son las siguientes: primavera, 68.8%; verano, 67.7%; otoño, 67.8%; invierno, 68.5% (Oyuela y Jiménez, 2010).

La tasa de preñez utilizando embriones congelados varía entre 41 y 45% (Naranjo *et. al.*, 2016).

4.4.4.3 Descripción de la técnica de la TE

Existen dos procesos para la preparación de los embriones a transferir, de acuerdo a si son embriones con congelación lenta o curva lenta, o vitrificación (Naranjo *et. al.*, 2016).

Las pajillas con embriones congelados por curva lenta se extraen del termo criogénico y se sumergen en agua a una temperatura de 37°C durante 30 segundos, después se retira el tapón de la pajilla y se coloca en el aplicador especial para la transferencia (Naranjo *et. al.*, 2016).

Los embriones vitrificados se extraen de su transportador y se sumergen en una gota de 500 μ l de una solución de calentamiento (SC) a 37°C por 1 minuto; posteriormente, se colocan 2 gotas de una solución de dilución (SD) a temperatura ambiente por 2 minutos; después, se colocan 3 gotas de 20 μ l en una solución de lavado (SL), durante 3 minutos; y finalmente, cada embrión es cargado en un aplicador de transferencia (Naranjo *et. al.*, 2016).

Para realizar la transferencia de embriones, primero debe determinarse la presencia de un CL por palpación rectal; una vez detectada la presencia de CL, se realiza la asepsia del perineo; después se aplica una inyección epidural con 1 ml de lidocaína (Pisicaina 2%); y posteriormente, se prepara un aplicador metálico especial para transferencia cubierto con una funda estéril, el cual, se introduce vía vaginal hasta llegar al cuerpo lúteo palpado, y se procede a liberar el embrión (Figura 25) (Naranjo *et. al.*, 2016).



Figura 25. Momento de la TE (Sommantico, 2018).

4.4.4.4 Selección de las hembras receptoras de acuerdo a la presencia de cuerpo lúteo

Antes de realizar la selección de las hembras receptoras para TE, se debió realizar una evaluación de aquellas hembras candidatas a ser receptoras, y posteriormente se les debió someter a un protocolo de sincronización para finalmente llevar a cabo una evaluación sobre la presencia o ausencia de CL para decidir si esas hembras recibirán TE (Brito, 2012).

Lo primero a realizar, es seleccionar hembras jóvenes, libres de enfermedades, de probada fertilidad y habilidad materna, con un tamaño adecuado que permita un parto fácil. Cuando ya se seleccionan candidatas a ser receptoras, lo primero a realizar es una inspección general de la hembra, abarcando sus antecedentes reproductivos (Brito, 2012).

Las hembras no deben presentar enfermedades hereditarias, es decir, que éstas no se encuentren enfermas o con antecedentes de alguna enfermedad crónica que pueda afectar al embrión; tampoco deben padecer ninguna anomalía a nivel aparato reproductivo en donde sufran irregularidades en el ciclo estral o que afecte su fertilidad; y no deben ser vacas muy viejas (Brito, 2012).

Una vez seleccionadas las receptoras, se procede a realizar el protocolo de sincronización. Y, ahora sí, se procede a seleccionar aquellas hembras con presencia de CL (Naranjo *et. al.*, 2016).

Por vía palpación rectal, se determina la presencia CL, los cuales deben tener una medida mayor a 1.5 cm de diámetro para considerarse viables para transferencia de embriones (Naranjo *et. al.*, 2016).

4.4.4.5 Diagnóstico de gestación

Es recomendable dejar pasar cierto tiempo entre la transferencia de embriones (o incluso cualquier otra técnica reproductiva) y el momento para realizar el diagnóstico de gestación, debido a que puede ocurrir retorno al estro postransferencia. Un momento recomendable es entre 30 y 45 días después de realizada la técnica (Martínez *et. al.*, 2007; Rodríguez *et. al.*, 2009).

El diagnóstico de gestación puede realizarse por ultrasonografía o palpación rectal, pero se recomienda la combinación de ambas técnicas (Martínez *et. al.*, 2007; Rodríguez *et. al.*, 2009).

También, se recomienda el monitoreo mensual de las receptoras preñadas hasta pasar los primeros 120 días de la gestación para tratar de evitar la presencia de abortos (Martínez *et. al.*, 2007).

La tasa de preñez que se busca obtener, de acuerdo al tipo de transferencia realizada, es de al menos 25% con transferencia de embriones congelados, y por lo menos 45% con transferencia de embriones en fresco (Martínez, 2013).

4.4.4.6 Factores que intervienen en la eficiencia de la TE

Los factores que podrían afectar los resultados de las tasas de preñez tienen diversos orígenes, y estos factores pueden clasificarse en extrínsecos (ambientales, manejo, alimentación) e intrínsecos (diámetro del cuerpo lúteo, factores asociados al embrión, estado del desarrollo del embrión) (Oyuela y Jiménez, 2010).

Estos son factores afectan no sólo la respuesta superovulatoria en las vacas, sino que también afectan los índices reproductivos (Oyuela y Jiménez, 2010).

4.4.4.6.1 Medio ambiente

Los factores ambientales pueden afectar los porcentajes de preñez, dentro de éstos, el estrés calórico ha sido uno de los factores que más se ha estudiado; pero no todos los autores han reportado cambios significativos en la fertilidad de las hembras relacionado al clima de las diferentes estaciones del año (Oyuela y Jiménez, 2010).

4.4.4.6.2 Prácticas de manejo

Las prácticas de manejo que pudieran afectar los resultados de la TE son la alimentación, estrés de los animales y en general todas las condiciones que afecten su bienestar animal (Oyuela y Jiménez, 2010).

4.4.4.6.3 Condición corporal

La condición corporal es también importante para determinar las tasas de preñez, pues las mejores tasas de gestación son obtenidas cuando, en ganado productor de carne, los valores van de 3 a 5 en la escala de 1 a 9 (Frasinelli *et. al.*, 2004; Oyuela, Jiménez, 2010).

4.4.4.6.4 Cuerpo lúteo

El CL presente al momento de la implantación del embrión es otro factor importante ya que se espera que haya una secreción suficiente de P4 por parte de éste para el mantenimiento de la gestación del embrión transferido. La P4 es secretada por parte del CL, el cual se forma en el mismo lugar del ovario donde ocurrió la ovulación que produjo la preñez, y ayuda en el establecimiento y mantenimiento de ésta, y a que se produzca un parto exitoso (Oyuela y Jiménez, 2010).

4.4.4.6.5 Estado de desarrollo del embrión

La transferencia de una mórula temprana resulta en tasas de gestación más bajas que cuando se transfieren embriones en estadio más avanzado (Oyuela y Jiménez, 2010).

Los embriones pueden clasificarse en 3 dependiendo de la velocidad para desarrollarse, en donde la tasa de gestación para embriones de calidad 1 (mejor calidad) ha sido de hasta 73.2%, para embriones de calidad 2 de 68.3% y para embriones de calidad 3 ha sido de 56.3%, pero entre éstos no hay diferencias en las diferentes fases del desarrollo embrionario. Esto se puede explicar debido a que al transferir un embrión en donde su desarrollo ha sido más rápido, éste podría expresar más pronto los factores de reconocimiento de preñez (Oyuela y Jiménez, 2010).

4.4.4.6.6 Dificultades técnicas al momento de realizar la TE

Depositar un embrión en el interior del cuerno uterino supone una invasión en el tracto reproductivo de la hembra, por lo tanto, esta técnica está asociada a posibles lesiones en el endometrio y a la consecuente producción de PGF2 α , lo cual reduciría las posibilidades de una gestación. Esto también quiere decir que es una técnica en la que es necesaria vasta experiencia (Oyuela y Jiménez, 2010).

4.4.4.6.7 Protocolo de sincronización hormonal para hembras receptoras

Es indispensable llevar a cabo un protocolo de sincronización de estro para tener éxito en la transferencia de embriones, empleando las hormonas que se consideren adecuadas para este procedimiento, y hay protocolos que pueden ser mucho más extensos (hasta 21 días) que otros, que en cuestión de 2 semanas ya se puede realizar la transferencia de embriones; también, otro punto a considerar es la cantidad de hormonas a utilizar, ya que hay protocolos en los que únicamente se utilizan 2 hormonas pero el proceso es más largo que aquellos en los que se utilizan hasta 3 hormonas y el proceso es más corto (Figura 26) (Oyuela y Jiménez, 2010).

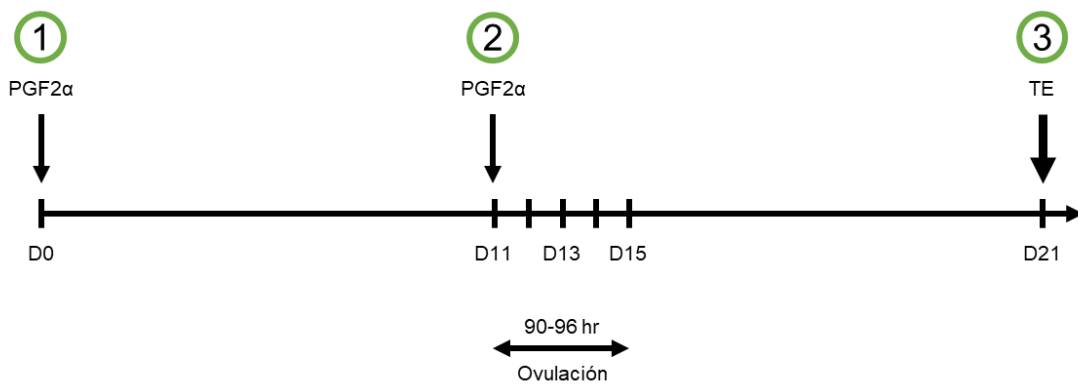


Figura 26. Protocolo de sincronización con PGF2α (Ruíz, 2016).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Ubicación del lugar

El trabajo de investigación se realizó en el Estado de Michoacán, en el municipio de Apatzingán ubicado en la región de Tierra Caliente, en el “Rancho Galeana” ubicado en Carretera Apatzingán-Aguililla km 12.5 (Figura 27).



Figura 27. Entrada principal del Rancho Galeana.

La localidad se caracteriza por tener una temperatura de entre 34 y 38°C, con probabilidad de precipitaciones de 30%, presión de 1012.9 mb, condensación de 22°, a una altura sobre el nivel del mar de 240 metros, y en las coordenadas siguientes: 18° 42' - 19° 14' de latitud norte y 102° 11' – 102° 39' de longitud oeste (The Weather Channel, 2018).

La unidad de producción “Rancho Galeana” se dedica a la producción de ganado para pie de cría de las razas Gyr, Nelore e Indubrasil. Los animales se encuentran en un sistema extensivo con suplementación estratégica.

Los animales consumen del potrero pasto estrella de África (*Cynodon lemfuensis*) y pasto Grama (*Cynodon dactylon*). Adicionalmente, reciben suplementación con sales minerales y agua *ad libidum*. Todos los animales reciben manejo cuando se suplementa, vacunan, desparasitan, realizan la aplicación de biotecnologías etc.

5.1.2 Selección de los animales

Se utilizaron 44 vacas puras de las razas Gyr, Nelore e Indubrasil para aspiración folicular con antecedente de ser buenas donadoras, con edad entre 2 a 16 años (Figura 28); y 94 vacas criollas para transferencia de embriones (Figura 29). Los vientres utilizados estaban con una condición corporal en promedio entre 4 al 6, en la escala del 1 al 9 descrita por Frasinelli *et. al.* (2004).



Figura 28. Selección de las vacas para aspiración folicular.



Figura 29. Selección de las vacas para transferencia de embriones.

Para la transferencia de embriones, conforme los animales fueron evaluados, se fueron descartando aquellas hembras que no presentaron cuerpo lúteo al momento de la transferencia (21/94), quedando un total de 73 hembras que recibieron transferencia de embriones.

5.2 Metodología

5.2.1 Aspiración de los ovocitos

La obtención de ovocitos se realizó por medio de la técnica de aspiración folicular *in vivo* bajo el siguiente procedimiento:

1. Una vez que la vaca ya se encontraba en la prensa, se comenzó por realizar la anestesia epidural con Lidocaína (Pisacaína 2%, 20 mg/ml), para provocar una disminución de movimientos peristálticos, y una vez anestesiado el animal, permita sujetar los ovarios para posteriormente realizar la aspiración (Figura

30). La dosis utilizada fue de 3-4 ml para la raza Nelore, y 2-3 ml para las razas Gyr e Indubrasil.



Figura 30. a) Frasco de Pisacaina 2%, 20 mg/ml; b) Aplicación de la anestesia epidural.

2. La aspiración se realizó con apoyo de un ultrasonido DP 2200 Vet (Figura 31), introduciendo el transductor por vía vaginal equipado con una aguja de aspiración 18G X 1 $\frac{3}{4}$.



Figura 31. Ultrasonido DP 2200 Vet.

3. El ultrasonido estuvo conectado a una bomba de vacío Bx 003D calibrada con una presión de 110 Pa, para aspirar los ovocitos (Figura 32).



Figura 32. Bomba de vacío Bx 003D, junto al ultrasonido.

4. Después de la anestesia epidural, se procedió a limpiar la vulva con alcohol al 70% (Figura 33).



Figura 33. a) Limpieza de la vulva con papel para retirar el excremento; b) y después con alcohol al 70% para volver a limpiar con papel.

5. Para el procedimiento de aspiración, se procedió a palpar, y a través del ultrasonido se observó el proceso de aspiración (Figura 34).

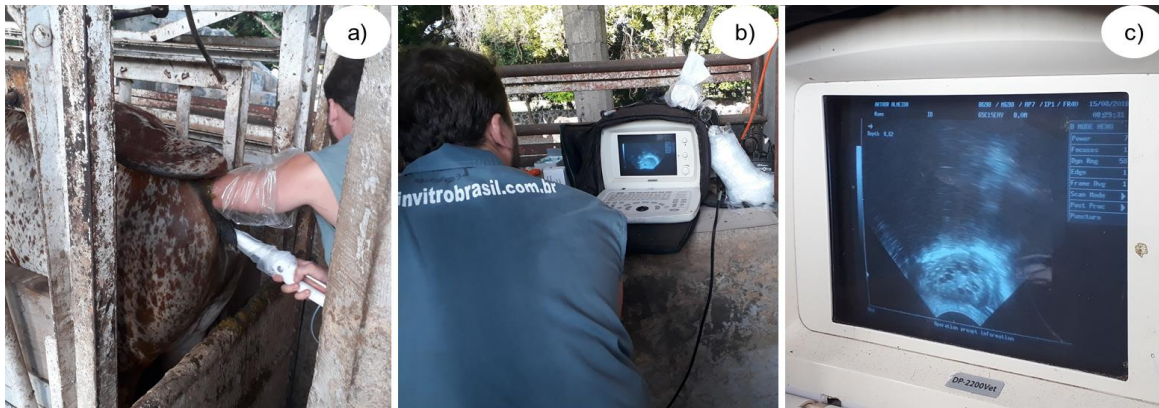


Figura 34. a) Introducción del transductor por vía vaginal y palpación; b) Búsqueda de folículos para aspirar; c) Observación de los folículos a aspirar.

6. Se utilizó una protección desechable para la guía de transductor con la aguja de aspiración, la cual, fue de una por vaca (Figura 35).



Figura 35. Protección desechable en la guía de transductor con la aguja de aspiración.

7. En los tubos de lavado se colectaron los ovocitos aspirados, estos tubos contienen solución Vigro y Heparina para el mantener el pH de los ovocitos aspirados y evitar la coagulación (Figura 36).



Figura 36. Tubos con ovocitos aspirados, cubiertos de la luz para evitar el daño hacia los ovocitos.

8. Posteriormente, se procedió a marcar cada tubo con un rotulador con el número del arete SINIGA de la vaca o, en caso de no tenerlo, con el número que tiene marcado en su miembro posterior izquierdo, y con su respectiva raza.

Estos tubos se mantuvieron a una temperatura aproximada de 38°C impidiendo que ésta cambie, y fueron cubiertos de la luz y enviados al laboratorio del Rancho Galeana para la colección y evaluación de los ovocitos.

5.2.2 Colección y evaluación de los ovocitos

La colección y evaluación de los ovocitos fueron realizadas bajo el siguiente procedimiento:

1. Los tubos de lavado fueron colocados en un calentador de tubos de la marca TED que ayudó a mantener la temperatura de 38 ° C, previa evaluación (Figura 37).



Figura 37. Calentador de tubos TED con los tubos con ovocitos colectados.

2. El contenido de cada tubo pasó a una placa de Petri con solución Vigro para realizar el primer lavado de los ovocitos, y después fueron filtrados para eliminar restos de células no deseadas (Figura 38).



Figura 38. Filtración de los ovocitos.

3. Los ovocitos pasaron a otra placa de Petri con ayuda de la solución Vigro (Figura 39); esta placa se colocó bajo el microscopio con el objetivo de 10x y después con 40x para llevar a cabo la observación de los ovocitos y en seguida su clasificación de acuerdo a su morfología según la técnica descrita por (Rafagnin *et. al.*, 2011) que los clasifica de la siguiente manera: GI, GII, GIII, desnudos, y atrésicos o citoplasmas (Figura 40). En donde, de acuerdo a la clasificación, GI, GII y GIII, son viables, mientras que los desnudos y atrésicos no.



Figura 39. Ovocitos filtrados en una nueva placa de Petri con solución Vigro.

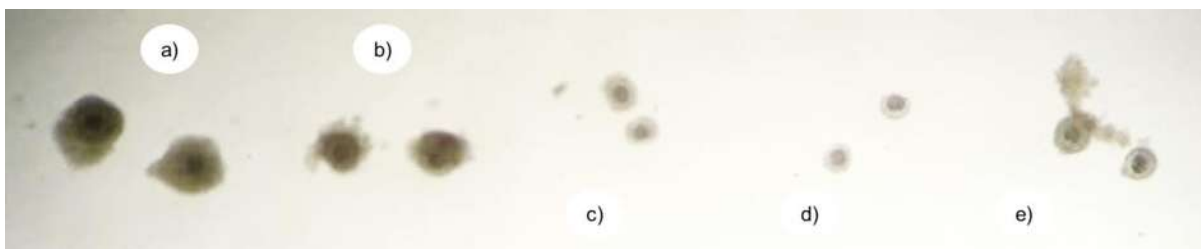


Figura 40. Clasificación de los ovocitos en a) GI, b) GII, c) GIII, d) Desnudos, e) Atrésicos o Citoplasmas.

4. Los ovocitos seleccionados pasaron con ayuda de una pipeta de aspiración de 3.5 mm de diámetro a una solución de lavado que ayudó a eliminar de mejor manera restos de excremento y sangre; la caja de Petri se mantuvo en una placa de calor de la marca WTA para no romper con la temperatura de los ovocitos y así evitar que éstos mueran (Figura 41).



Figura 41. Colocación de los ovocitos clasificados viables en una caja de Petri nueva sobre la placa de calor WTA.

5. Y en una planilla se anotaron datos como: raza y número de la vaca donadora de los ovocitos evaluados, categoría de los ovocitos, número de ovocitos viables, número de ovocitos no viables, número de ovocitos totales, y la hora en que se procedió a envasar para tenerlo presente al momento de realizar la fertilización de los ovocitos *in vitro*, ya que éstos sólo son viables en un máximo 24 horas (Figura 42).

Nº	Toro	Raza	Donadora (Identificación/Nombre)	Raza	Gl	Gil	Gili	Viabiles	Desn.	Cit.	Tot. (Lab.)	Desc.	Total (OPU)	Hora
1	PFOD/40		18-01	V VZ	INW	1	1	1	1	1	2	1	3	8:27
2	GUREN/DAVID		32-06	N VZ	NEL	1	53	54	2	3	59	2	61	8:37
3	RIGBENSEX		10-06	N VZ	NEL	4	49	53	1	31	88	6	94	8:53
4	RIGBENSEX		26-6	N VZ		3	60	70	15	85	94	9	103	9:08
5	GUREN		6-6	V VZ		1	20	20	4	5	24	2	26	9:12
6	RIGBENSEX		83-6	N VZ		1	23	73	4	33	110	17	127	9:23
7	KALIKA		3-6	HIDROMETRIA V VZ	GYR	1	23	8	2	10	10	1	11	9:39
8	RIGBENSEX		29-08	V VZ	NEL	1	51	51	2	55	55	2	57	9:49
9	RIGBENSEX		22-2	V VZ		1	125	125	5	130	134	11	145	10:04
10	RIGBENSEX		12-3	V VZ		2	22	24	1	23	24	1	25	10:19
11	RIGBENSEX		8-6	N VZ		1	43	43	2	45	45	3	48	10:27
12	RIGBENSEX		13-4	V VZ		1	11	11	1	12	12	1	13	10:32
13	RIGBENSEX		36-7	V VZ		5	68	73	4	72	84	7	91	10:56
14	RIGBENSEX		44-8	V VZ		1	98	98	5	103	107	7	114	11:13
15	RIGBENSEX		48-8	V VZ		1	44	44	2	46	46	2	48	11:28
16	RIGBENSEX		61-8	V VZ		1	87	87	2	89	89	4	93	11:42
17	RIGBENSEX		39-5	V VZ		4	28	28	1	29	29	2	31	12:03
18	RIGBENSEX		20-3	V VZ		1	5	5	2	7	7	3	10	12:17
19	RIGBENSEX		26-1	V VZ		3	6	6	1	7	7	1	8	12:23
20	DAVID/ABIGAIL		9-6	V VZ		1	65	71	4	6	81	11	92	12:38
					Total									

Figura 42. Registro de los ovocitos aspirados con sus características y la hora de envase.

5.2.3 Envase y transporte de los ovocitos

Para el envase y transporte de los ovocitos se realizó el siguiente procedimiento:

1. Una vez que los ovocitos pasaron por la solución de lavado, con ayuda de una pipeta fueron transportados a un tubo con medio de maduración (propio de la empresa IVB).
2. Al tubo, ya con los ovocitos, se le colocó una cantidad de gas (tomando como unidad de medida 3-4 segundos), el cual, contiene una mezcla de dióxido de carbono, nitrógeno y oxígeno, para mantener el pH de los ovocitos; y después fue sellado y marcado con rotulador con el número de tubo procesado y el número de la vaca (Figura 43).

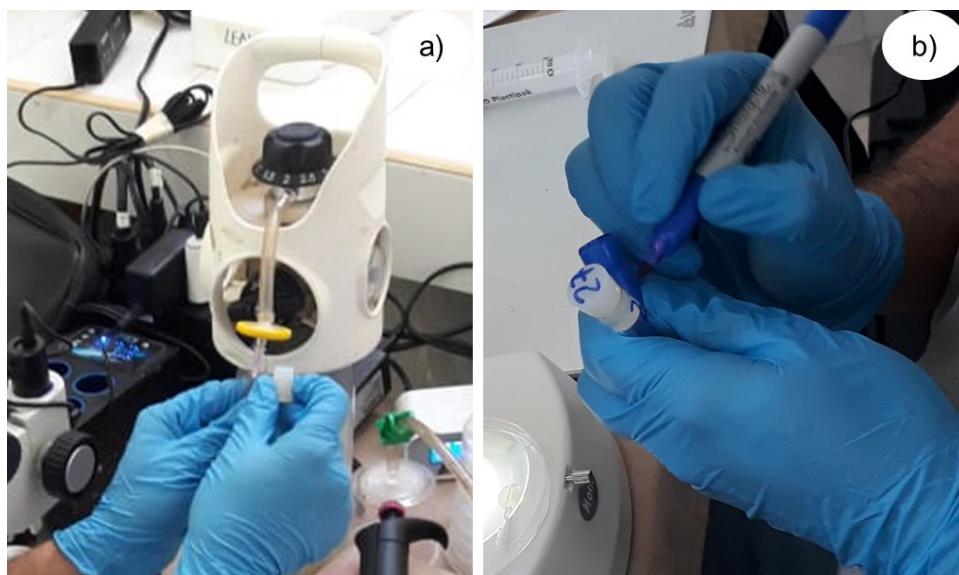


Figura 43. a) Colocación del gas; b) marcado del tubo con rotulador para su identificación.

3. Los tubos ya marcados fueron colocados en una transportadora MICRO-Q 02 calibrada a 38°C para mantener a los ovocitos (Figura 44).



Figura 44. Colocación de los tubos en la transportadora MICRO-Q 22.

5.2.4 Fertilización *in vitro*

La transportadora fue enviada al municipio de Torreón, Coahuila, en la empresa In Vitro Brasil, localizada en Blvd Independencia 720, Segundo de Cobián Centro, 27000, para llevar a cabo la fecundación *in vitro*.

5.2.5 Transferencia de embriones

Antes de realizar la transferencia de embriones en las hembras receptoras, se llevó a cabo un protocolo de sincronización de celo, el cual se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Protocolo hormonal asignado por In Vitro Brasil para transferencia de embriones.

Días	Hormonas	Responsables
Día 0	Poner implantes de Progesterona y aplicar 2 ml de Benzoato de Estradiol	Personal del rancho y equipo veterinario
Día 8	Sacar implantes, aplicar 2 ml de ECG, 1 ml de ECP y 2 ml de Prostaglandina	Personal del rancho
Día 9	Aspiración de las donadoras	Personal del rancho y equipo veterinario
Día 17	Transferencia de los embriones	Personal del rancho y equipo veterinario

Se realizaron dos transferencias de embriones, una con embriones en fresco (n=52) y otra con embriones congelados (n=21).

Ambas transferencias iniciaron de la siguiente manera:

Se comenzó por realizar la anestesia epidural con Lidocaína a dosis de 2-4 ml en vacas criollas (Pisacaína 2%, 20 mg/ml), para disminución de movimientos peristálticos, y una vez anestesiado el animal se procedió a palpar por vía rectal los ovarios para identificar si la hembra tenía presencia de un CL, indicativo de una previa ovulación (Figura 45). Se utilizó un ultrasonido portátil CTS-800 para confirmar el diagnóstico del CL, en las vacas que lo requirieron (Figura 46). A las vacas que no presentaron CL, no se les realizó la transferencia del embrión en fresco (9/61) ni al grupo de transferencia de embriones congelados (12/33).



Figura 45. Palpación vía rectal.



Figura 46. Ultrasonido portátil CTS-800.

Para la transferencia de embriones en fresco se realizó lo siguiente:

1. Los embriones a transferir fueron manejados en una transportadora de embriones de la marca MICRO Q TECHNOLOGIES del laboratorio IVB al rancho Galeana, a una temperatura de 36 ° C (Figura 47).



Figura 47. Transportadora de embriones MICRO Q TECHNOLOGIES.

2. Para las vacas aptas para la transferencia, se realizó la preparación de la pistola para transferencia de embriones colocando la pajilla con el embrión y colocando una funda y chemisse (camisa sanitaria) (Figura 48).



Figura 48. a) Pajilla con el embrión; b) Pistola para transferencia.

Para la transferencia de embriones congelados se realizó lo siguiente:

1. Los embriones a transferir fueron sacados de un termo con nitrógeno líquido (Figura 49), y fueron descongelados en un termo descongelador eléctrico ABS a una temperatura de 35°C por 45 segundos (Figura 50).



Figura 49. Termo con nitrógeno líquido, en donde se encuentran contenidas las pajillas con los embriones.



Figura 50. Termo descongizador eléctrico ABS.

2. El proceso para realizar la transferencia de embriones a las vacas receptoras aptas fue el mismo que se utilizó para la transferencia de embriones en fresco.

Para ambas transferencias de embriones se llevó a cabo lo siguiente:

1. Se realizó, con apoyo de la palpación rectal, la introducción de la pistola de transferencia de embriones, previa asepsia de la vulva, por vía vaginal (Figura 51).



Figura 51. Introducción de la pistola por vía vaginal y palpación rectal para realizar la transferencia de embriones.

2. El embrión fue depositado a la altura de la curvatura mayor del cuerno en donde se encuentra el ovario que ovuló, aproximadamente 2 cm adelante de la bifurcación del útero.
3. Finalmente, en una bitácora se registró el número de arete de cada vaca manejada y la raza del embrión transferido, además del nombre del padre y la identificación de la madre del embrión (Figura 52).

Nº	Receptora	Embrón	C.L.	Diagnóstico		Donadora (Identificación/Nombre)	Raza	Toro (Identificación/Nombre)	Raza	Observación para examen
				P	Sex					
1	3534	BX				39-5	Gyr	San sã	Gyr	VQ
2	2435									
3	3600									
4	3172									
5	3563									
6	3231									
7	3564									
8	3473									
9	4089									
10	9213									
11	1753									
12	1426									
13	3567									
14	8602									
15	1424									
16	8618									
17	7847									
18	3576									
19	3474									
20	1428									
21	3796					8-2				
22	3523	3523								
23	3523									
24	3524									
25	4049									
26	3491									
27	3494									
28	3494 4121	2/2								
29										
30										
31	3499					34-3	INDO MOREIRA	INDO		
32	2214									
33	3498									
34	3507									
35	3527									
36	3488	1860								
37	3488									
38	3483									

Figura 52. Registro de los embriones transferidos y de las vacas que no recibieron la transferencia de embriones.

5.2.6 Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación para las hembras que recibieron la transferencia de embriones en fresco y congelado se realizó a 63 y 71 días, respectivamente.

5.3 Análisis estadístico

- ✓ Se realizó un análisis descriptivo con el uso de Microsoft Excel para crear tablas de doble entrada, para evaluar el número, promedio y porcentaje de los ovocitos

aspirados tanto viables como no viables en las tres diferentes razas *Bos indicus* de estudio; también, se comparó el porcentaje de gestación entre la transferencia de embriones en fresco y la transferencia de embriones congelados.

- ✓ Se realizó la prueba de Chi Cuadrado con margen de confianza de 95% para analizar si existe diferencia entre el promedio de ovocitos aspirados y ovocitos viables entre en las razas Nelore, Gyr e Indubrasil, y también para determinar si existe diferencia entre el tipo de transferencia de embriones utilizada (en fresco vs congelado) en los porcentajes de gestación.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron un total de 2,400 ovocitos obtenidos de las razas Nelore (1,260), Gyr (442) e Indubrasil (698); de los cuales (1,027), (310) y (559), respectivamente fueron los viables. De los ovocitos colectados se obtuvo el promedio de ovocitos aspirados, de los viables y de los no viables de las tres razas (Tabla 2).

También, se determinó el porcentaje de gestación obtenido con la transferencia de embriones en fresco y con la transferencia de embriones congelados.

Tabla 2. Promedio de ovocitos aspirados en vacas <i>Bos indicus</i> en pastoreo.						
Razas	No viables		Viables		Total de ovocitos aspirados	
	Por vaca	%	Por vaca	%	Por vaca	%
Nelore (n= 22)	11.65 ± 9.16	18.49	51.35 ^a ± 33.30	81.51	63.00 ^a ± 38.22	100.00
Gyr (n= 8)	16.50 ± 7.63	29.86	38.75 ^b ± 25.27	70.14	55.25 ^b ± 41.47	100.00
Indubrasil (n= 16)	8.69 ± 8.20	19.91	34.94 ^b ± 27.96	80.09	43.63 ^c ± 34.56	100.00
Las tres razas (n= 44)	12.28 ± 8.33	22.76	41.68 ± 30.44	77.24	53.96 ± 38.09	100.00

^{abc} Diferente literal dentro de la misma columna significa diferencia significativa (P< 0.05)

Gimenes *et. al.* (2015) reportaron promedios similares de ovocitos aspirados en razas *Bos indicus*, los cuales rondan entre los 37 y 40 ovocitos obtenidos. Por otro lado Guerreiro *et. al.* (2014) obtuvieron un promedio similar (50 ovocitos aspirados para las razas *Bos indicus*) al obtenido en el presente estudio; sin embargo de la raza Nelore obtuvieron una menor cantidad de ovocitos (54.30) respecto a los aspirados en el esta investigación.

Solís *et. al.* (2012) obtuvieron promedios más bajos en razas *Bos indicus*, cuyo rango va de 18 hasta 36 ovocitos aspirados, por lo que sus resultados no coinciden con los obtenidos en el presente trabajo.

Cabe mencionar que de las 3 razas evaluadas, la raza Gyr tuvo un menor porcentaje de ovocitos viables comparado con la Nelore e Indubrasil.

Las tasas de viabilidad de las tres razas (77.24%) fueron inferiores a lo reportado por Gimenes *et. al.* (2015), quienes obtuvieron porcentajes de ovocitos viables del 82.3%. En cambio, Guerreiro *et. al.* (2014) encontraron porcentajes de ovocitos viables (74%) similares a los de la presente investigación.

Existe diferencia entre razas en cuanto al promedio de ovocitos aspirados y al promedio de ovocitos viables por vaca, lo que significa que el promedio de ovocitos obtenidos es dependiente de cada raza.

El promedio de ovocitos obtenidos por raza del presente trabajo tiene relación con lo reportado por Amilcar (2015), ya que obtuvo un promedio de 38 ovocitos aspirados en razas *Bos indicus*, pero que hay excepciones en algunas razas, como en la Nelore, en la que reporta una aspiración de 53 ovocitos por sesión.

Guerreiro *et. al.* (2014) reportó algo similar en su estudio, en donde el promedio más alto fue de 54.3 ovocitos aspirados y lo obtuvo en una hembra de la raza Nelore, concluyendo así que hay razas que son mejores donadoras que otras, y también, que el promedio obtenido depende de cada hembra.

Los rangos de los promedios obtenidos de los ovocitos aspirados en el presente trabajo se encuentran bastante dispersos en las razas Nelore (24.78-101.22), Gyr (13.78-96.72) e Indubrasil (9.07-78.18), a diferencia de lo reportado por Alvarado, (2017) ya que obtuvo una mayor uniformidad en cuanto al promedio de ovocitos obtenidos en diferentes vacas *Bos indicus* no puras, y sus resultados muestran que el promedio más alto fue de 44 ovocitos viables y el promedio más bajo fue de 27.

Tabla 3. Clasificación de ovocitos viables de acuerdo al número de capas de células del *cumulus oophorus* obtenidos de vacas *Bos indicus* en pastoreo.

Razas	GI		GII		GIII		Ovocitos viables	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Nelore	12	0.95	28	2.22	987	78.33	1,027	81.51
Gyr	0	0.00	1	0.23	309	69.91	310	70.14
Indubrasil	0	0.00	11	1.58	548	78.51	559	80.09
De las tres razas	12	0.49	40	1.63	1844	75.12	1,896	77.24

GI= *Cumulus* con más de 3 capas de capas de células
 GII= *Cumulus* con menos de 3 capas de células
 GIII= Ovocito con ovoplasma contraído

Adaptado de Rafagnin *et. al.* (2011)

En la tabla 3, se presentan los resultados obtenidos en la clasificación de los ovocitos viables. La mayoría de los ovocitos viables fueron clasificados GIII (75.12%) mientras que el porcentaje más bajo corresponde a GI (0.49%), el cual pertenece únicamente a la raza Nelore.

Solís *et. al.* (2012) realizaron la misma clasificación de los ovocitos viables, obteniendo que el 86.92% pertenece a ovocitos viables y el 13.08% pertenece a los no viables; los cuales, son resultados superiores a los obtenidos en el presente trabajo, ya que en éste se obtuvieron 77.24% de ovocitos viables y 22.76% de ovocitos no viables. Además, el porcentaje de ovocitos por categoría que obtuvieron Solís *et. al.* (2012) es

mayor al encontrado en esta investigación, en donde ellos reportaron 14.4% para GI y 25.83% para GII, mientras que en los resultados presentados en este trabajo se obtuvieron 0.49% para GI y 1.63% para GII.

Tabla 4. Transferencia de embriones (*Bos indicus*) a vacas criollas bajo condiciones de pastoreo en la región Tierra Caliente.

	Vacas receptoras	Vacas que recibieron embrión		Vacas que no quedaron gestantes*		Vacas gestantes
	n	n	%	n	n	%
En fresco	61	52	100.00	9	22	42.3 ^a
Congelados	33	21	100.00	12	1	4.76 ^b

* Son aquellas vacas que no presentaron cuerpo lúteo, por lo tanto no recibieron embrión

^{ab} Diferente literal dentro de la misma columna significa diferencia significativa ($P < 0.05$)

En la tabla 4, se presentan dos tipos de transferencias de embriones, de las cuales una es transferencia de embriones en fresco y la otra es transferencia de embriones congelados.

Existe una variabilidad entre el número de hembras gestantes en relación a la técnica de transferencia de embriones empleada. El resultado obtenido fue que la cantidad de hembras gestantes sí depende de la técnica de transferencia de embriones utilizada.

Oyuela y Jiménez (2010) reportaron un porcentaje de gestación con transferencia de embriones en fresco que va de 67.7 a 68.8%; el cual es superior al obtenido en el presente trabajo (42.31%) con transferencia en fresco y aun mayor al obtenido con transferencia de embriones congelados (4.76%).

Zárate *et. al.* (2018) reportaron tasas de gestaciones con transferencia de embriones en fresco de 30 a 60%, y 25.9% para transferencia de embriones congelados. El porcentaje de gestación obtenido en esta investigación coincide con el rango reportado por Zárate *et. al.* (2018); pero difiere al resultado obtenido de la transferencia de embriones congelados (4.76%).

Vera (2017) reportó índices de concepción más altos, en donde la tasa de gestación promedio alcanza el 54% para embriones transferidos en fresco, y el 51% para la transferencia de embriones congelados. Por lo tanto, sus resultados son superiores a los obtenidos en este trabajo.

Existen diferentes porcentajes esperados de gestación de acuerdo a la transferencia de embriones en fresco vs congelados, tal como lo mencionan los autores anteriormente citados. De acuerdo con Oyuela y Jiménez (2010), el porcentaje de gestación para transferencia de embriones en fresco es más alto, hasta 68.8% en comparación con la transferencia de embriones congelados, en donde se alcanzan hasta el 51% de gestación, según lo reportado por Vera (2017).

VII. CONCLUSIÓN

En las vacas de raza Nelore, Gyr e Indubrasil bajo condiciones de pastoreo en la región de Tierra Caliente se obtiene una cantidad muy variable de ovocitos, con más del 70% de ovocitos viables. De raza Nelore se aspiraron mayor cantidad de ovocitos y la Indubrasil fue la que menos produjo.

En la transferencia de embriones en fresco se obtuvo mayor porcentaje de gestación respecto a la transferencia con embriones congelados bajo condiciones del presente estudio.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Albarracín Monje José Luis. 2005. Vitricación de Ovocitos Bovinos Mediante la Técnica Open Pulled Straw: Estudio Estructural de Cromosomas, Microtúbulos y Microfilamentos y Posterior Desarrollo Embrionario In Vitro. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina Veterinaria. Programa de Doctorado en Medicina y Cirugía en Animales. Barcelona, España.
2. Alvarado Ulloa Jhonatan Marcelo. 2017. Evaluación de la Calidad de Ovocitos Provenientes de Vaconas Criollas y Ovarios de Matadero. (Tesis de maestría). Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cuenca, Ecuador.
3. Amilcar Gabriel. 2015. Simposio Internacional de Reproducción Animal: Resúmenes. 1ra edición. Instituto de Reproducción Animal, Córdoba. Córdoba, Argentina. p. 48, 61.
4. Armstrong D. T. 2001. Effects of Maternal Age on Oocyte Developmental Competence. *Theriogenology*. 55(6): 1310.
5. Azambuja R. M.; Watanabe M. R.; Lôbo R. B. 1997. Efeito da Experiência do Veterinário na Aspiração *In Vivo* de Oócitos de Vacas Zebuínas através da Ultrassonografia. Resultados preliminares. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*. 26(1): 171.
6. Báez Contreras Francisco J.; Chávez Corona Adeymi C.; Hernández Fonseca Hugo J.; Villamediana Monreal Patricia C. 2010. Evaluación de la Capacidad

de Desarrollo *In Vitro* de Ovocitos Bovinos Provenientes de Vacas con Predominancia Fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. Revista Científica FCV-LUZ. 20(3): 264.

7. Betancourth Jorge Fernando; Cáceres Gutiérrez Gabriel. 2011. Superovulación y Transferencia de Embriones en Vacas Lecheras Utilizando dos Protocolos Hormonales. (Tesis de licenciatura). Universidad Zamorano. Licenciatura Ciencia y Producción Agropecuaria. Zamorano, Honduras.
8. Brandan Nora C. Hormonas Hipotalámicas e Hipofisiarias [en línea] 2011 <<https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/hhh.pdf>> [Consulta: 16 de agosto de 2019].
9. Brandan Nora C. Principios de Endocrinología [en línea] 2014 <<http://www.med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/PRINCIPIOS%20DE%20ENDOCRINOLOG%C3%80DA.pdf>> [Consulta: 16 de agosto de 2019].
10. Brito Pintado Boris Javier. 2012. Manejo de Receptoras en Programas de Transferencia de Embriones a Tiempo Fijo. (Tesis de licenciatura). Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Cuenca, Ecuador.
11. Caicedo Jaime Enrique. 2008. Aplicaciones de la Aspiración Folicular-Fertilización *In Vitro* en Bovinos y Factores que pueden Afectar su Eficiencia. (Tesis de maestría). Universidad la Salle. Facultad de Medicina Veterinaria.

Postgrados en Ciencias Veterinarias. Especialización Biotecnología de la Reproducción. Bogotá, Colombia.

12. Catalano Rodolfo; Callejas Santiago. 2001. Detección de Celos en Bovinos. Factores que la Afectan y Métodos de Ayuda. Revista de Medicina Veterinaria. Vol. 82. 5, 6.
13. Colazo M.G.; Mapletoft, R.J. 2014. Fisiología del Ciclo Estral Bovino. Rev. Ciencias Veterinarias. 16(2): 31, 32.
14. Córdoba. Reproducción Asistida en Bovinos Usando Ovum Pick-Up (OPU) y Up (OPU) y Fecundación *In Vitro* [en línea] 2009 <http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/16_11_50_8_CORDOBA.pdf> [Consulta: 21 de agosto de 2019].
15. Correa Orozco Adriana; Uribe Velásquez Luis Fernando. 2010. La Condición Corporal Como Herramienta para Pronosticar el Potencial Reproductivo en Vacas de Carne. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. 63(2): 5609-5612.
16. Curtis Helena; Barnes N. Sue; Schnek Adriana; Massarini Alicia. 2008. Biología. 7ma edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. p. 675, 790.
17. Dayan A.; Watanabe M. R.; Watanabe Y. F. 2000. Fatores que Interferem na Produção Comercial de Embriões FIV. Arq. Fac. Vet. 28(1): 181, 182.

18. Denis. R. 2008. Aspiración Folicular *In Vivo* (OPU) Una Nueva Perspectiva en el Campo de las Biotecnologías de la Reproducción. Ciencia y Tecnología Ganadera. 2(2): 58-65.
19. FAO. Producción Cárnica a Nivel Mundial [en línea] 2018 <<http://www.fao.org/3/a-BT089s.pdf>> [Consulta: 16 de agosto de 2019].
20. Filipiak Yael; Larocca Clara. 2010. Fertilización *In Vitro* en Bovinos. Facultad de Veterinaria – Universidad de la República Departamento de Reproducción Animal Área de Biotecnología. Montevideo, República Oriental del Uruguay. p. 2-13, 15-18.
21. Franco Jackeline; Uribe Velázquez Luis Fernando. 2011. Hormonas Reproductivas de Importancia Veterinaria en Hembras Domésticas Rumiantes. Rev. Biosalud. 11(1): 42, 43, 45, 46.
22. Frasinelli C. A.; Casagrande H. J.; Veneciano J. H. 2004. La Condición Corporal como Herramienta de Manejo en Rodeos de Cría Bovina. EEA San Luis INTA. No. 168. 3, 5.
23. García Roselló E. Revisión Bibliográfica. Reproducción [en línea] 2005 <<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/10850/egr03de10.pdf?sequence=3>> [Consulta: 3 de julio de 2019].
24. Gimenes L. U.; Ferraz M. L.; Fantinato-Neto P.; Chiaratti M. R.; Sá Filho M. F.; Meirelles F. V.; Trinca L. A.; Rennó F. P.; Watanabe Y. F.; Baruselli P. S. 2015. The Interval Between the Emergence of Pharmacologically

Synchronized Ovarian Follicular Waves and Ovum Pickup does not Significantly Affect *In Vitro* Embryo Production in *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Babalis*. *Theriogenology*. 83(3): 390.

25. Gobierno del Estado de Michoacán de Ocampo. Plan de Desarrollo Integral del Estado de Michoacán 2012-2015 [en línea] 2016 <<http://publicadorlaip.michoacan.gob.mx/itdif/2014/71/Programa%20Sectorial%20de%20Desarrollo%20Rural%202012-2015.pdf>> [Consulta: 7 de junio de 2019].

26. Gonella Diaza Ángela María; Atuesta Bustos Jorge Eduardo; Bernal Ulloa Sandra Milena; Chacón Jaramillo Liliana. 2013. Generalidades de la Producción de Embriones Bovinos *In Vitro*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 4(1): 72-76.

27. Guerra R.; Solis A.; Sandoya G.; de Armas R. 2012. Evaluación de Tres Protocolos de Criopreservación de Embriones Bovinos Obtenidos *In Vivo* e *In Vitro*. *REDVET*. 13(10): 3, 5-7.

28. Guerreiro B. M.; Batista E. O. S.; Vieira L. M.; Sá Filho M. F.; Rodrigues C. A.; Castro Netto A.; Silveira C. R. A.; Bayeux B. M.; Dias E. A. R.; Monteiro F. M.; Accorsi R. N.; Lopes V. R.; Baruselli P. S. 2014. Plasma anti-mullerian Hormone: an Endocrine Marker for *In Vitro* Embryo Production from *Bos taurus* and *Bos indicus* Donor. *Domestic Animal Endocrinology*. 49(0): 102-103.

29. Hafez E. S. E; Hafez B. 2005. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ma edición. Ed. Mc Graw Hill. México, D.F. p. 33-36, 38-42, 44-47, 51, 56, 60, 63, 164, 165.
30. Henao Guillermo; Trujillo Luis Emilio; Vásquez José Fernando; Rúa Luis. 2002. Actividad Ovárica Durante el Posparto Temprano de Vacas Cebú en Amamantamiento. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 55(1): 1443.
31. Hernández Cerón Joel. Fisiología Clínica de la Reproducción de Bovinos Lecheros [en línea] 2017 <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/publicaciones/archivos/Fisiologia_Clinica.pdf> [Consulta: 3 de julio de 2019].
32. Konrad J. L.; Scian R.; Garrido M. J.; Taminelli G.; Sansinena M. 2013. Producción de Embriones de Búfalo por Fertilización *In Vitro* luego de la maduración de los Ovocitos Durante el Transporte Prolongado. Rev. Vet. 24(2): 98, 99.
33. Kruip T. H.; A. M.; Boni R.; Wurth Y. A.; Roelofsen M. W. M.; Pieterse M. C. 1994. Potential use of Ovum Pick-Up for Embryo Production and Breeding in Cattle. Theriogenology. Vol. 42. 675, 676.
34. López Sánchez Carmen; García López Virginio; Mijares José; Domínguez José Antonio; Sánchez Margallo Francisco M.; Álvarez Miguel Ignacio Santiago; García Martínez Virginio. 2013. Gastrulación: Proceso Clave en la Formación de un Nuevo Organismo. Rev. Asoc. Est. Biol. Rep. 18(1): 34.

35. Martínez Díaz M. A.; Gatica R.; Correa J. E.; Eyestone W. 2007. Gestaciones Producidas con Embriones Bovinos Clonados por Transferencia Nuclear. Rev. Med. Vet. 39(1): 60, 61.
36. Martínez Martínez Yaíza. 2013. Análisis de la Morfología Ovocitaria en Bovina Previa a Fecundación *In Vitro*. (Tesis de maestría). Universidad de Oviedo. Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción. Oviedo, España.
37. Motta Delgado Pablo Andrés; Ramos Cuéllar Natalia; González Sánchez Claudia Mery; Castro Rojas Egna Cristina. 2011. Dinámica Folicular en la Vida Reproductiva de la Hembras Bovina. Vet. Zootec. 5(2): 89-95.
38. Muñoz María Gladys. Fisiología de Gametos [en línea] 2011 <http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/libro_reproduccionbovina/cap1.PDF> [Consulta: 3 de julio de 2019].
39. Naranjo Chacón Fernando; Becerril Pérez Carlos Miguel; Canseco Sedano Rodolfo; Zárate Guevara Oscar Enrique; Soto Estrada Alejandra; Rosales Martínez Froylan; Rosendo Ponce Adalberto. 2016. Comparación de dos Métodos de Transferencia de Embriones en el Ganado Criollo Lechero Tropical. Revista Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 3(7): 113-118.
40. Oyuela L. A.; Jiménez C. 2010. Factores que Afectan la Tasa de Preñez en Programas de Transferencia de Embriones. Rev. Med. Vet. Zoot. Vol. 57. 192-199.

41. Peláez Peláez Verónica Alejandra. 2011. Producción *In Vitro* de Embriones Bovinos. (Tesis de licenciatura). Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Cuenca, Ecuador.
42. Rafagnin L. S.; Fernandes da Silva K. C.; Gomes Dos Santos G. M.; Fortes P. J. H.; Seneda M. M. 2011. Producción *In Vitro* de Embriones de Razas Lecheras a Gran Escala. Rev. Spermova. 1(1): 87.
43. Rivera Gaona Miguel Germán. Fertilización *In Vitro* [en línea] 2019 <http://tecnicasreproduccionasistidabovinos.blogspot.com/p/blog-page_11.html> [Consulta: 21 de agosto de 2019].
44. Rodríguez Castañeda Oscar Armando; Díaz Bolaños Ramiro; Ortiz González Oscar; G. Gutiérrez Carlos; H. Montaldo Hugo; García Ortiz Carlos; Hernández Cerón Joel. 2009. Porcentaje de Concepción al Primer Servicio en Vacas Holstein Tratadas con Hormona Bovina del Crecimiento en la Inseminación. Revista Vet. Méx. 40(1): 2.
45. Rodríguez Marcela; Vallejo Adriana; Batista Paula; Espasandin Ana C. 2011. Biotecnologías Reproductivas Aplicadas a la Mejora Genética Animal. Rev. Cangüe. No. 31: 44-49.
46. Ruíz J. Andrés F. Protocolos de Sincronización de Celos Bovinos Utilizando Prostaglandinas (PGF2 α) para Inseminación Artificial (IA) o Transferencia de Embriones (TE) [en línea] 2016 <<https://www.genbiogan.com/single-post/2016/12/16/Protocolos-de-sincronizaci%C3%B3n-de-celos-bovinos->

utilizando-prostaglandinas-PGF2%CE%B1-para-Inseminaci%C3%B3n-Artificial-IA-o-Transferencia-de-Embriones-TE> [Consulta: 21 de agosto de 2019].

47. SADER. Ganadería a la Mexicana [en línea] 2018 <<https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/ganaderia-a-la-mexicana>> [Consulta: 7 de junio de 2019].
48. Sauvé R. 1998. Ultrasound Guided Follicular Aspiration and *In Vitro* Fertilization. Arq. Fac. Vet. 26(1): 141, 142.
49. SERIDA. Biotecnologías Reproductivas: Producción y Criopreservación de embriones *In Vitro* [en línea] 2011 <<http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4578>> [Consulta: 21 de agosto de 2019].
50. SIAP. Anuario Estadístico de la Producción Ganadera. Bovinos [en línea] 2019 <https://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/> [Consulta: 16 de agosto de 2019].
51. SIAP. Concentrado Nacional, Avance Acumulado de la Producción Pecuaria [en línea] 2019 <http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecConcentrado.jsp> [Consulta: 16 de agosto de 2019].
52. Silber Sherman J.; Nagy Zsolt P.; Liu Jiaen; Godoy Hugo; Devroey Paul; Van Steirteghem Andre C. Conventional *In Vitro* Fertilization versus

Intracytoplasmic Sperm Injection for Patients Requiring Microsurgical Sperm Aspiration [en línea] 1994 <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.992.8054&rep=rep1&type=pdf>> [Consulta: 21 de agosto de 2019].

53. Solís Corrales A.; Guerra R.; Sandoya G.; de Armas R. 2012. Efecto de Sincronización de la Onda Folicular y de la Frecuencia de Aspiración Folicular de Folículos en Novillas de la Raza Brahman. REDVET. 13(10): 1, 12.
54. Sommantico Solana. Transferencia Embrionaria: la Opción para Mejorar la Genética del Rodeo Bovino [en línea] 2018 <<https://www.infocampo.com.ar/transferencia-embrionaria-la-opcion-para-mejorar-la-genetica-del-rodeo-bovino/>> [Consulta: 21 de agosto de 2019].
55. The Weather Channel. Pronóstico del tiempo y condiciones meteorológicas para Apatzingán, México [en línea] 2018 <<https://weather.com/es-MX/tiempo/hoy/l/19.08,-102.35?par=google>> [Consulta: 5 de septiembre de 2018].
56. Ugalde J. Ramón. 2014. Biotecnologías Reproductivas para el Siglo XXI. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 48(1): 33, 34.
57. Vélez Marín Miryam; Uribe Velásquez Luis Fernando. 2010. ¿Cómo Afecta el Estrés Calórico la Reproducción? Rev. Biosalud. 9(2): 83-85.
58. Vera Cedeño Jofre Andrés. 2017. Efecto del Celo y el Tratamiento con GnRH sobre la Tasa de Concepción en Programas de Inseminación Artificial y

Transferencia de Embriones Bovinos. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Instituto de Reproducción Animal Córdoba. Córdoba, Argentina.

59. Watanabe Y. F.; Watanabe M. R.; Dayan A.; Vila R. A.; Lôbo R. B. 1998. Competência de Oócitos, Oriundos de Diferentes Fêmeas Bovinas, na Produção *In Vitro* de Blastocistos. Arq. Fac. Vet. 26(1): 384, 385.
60. Zárate Guevara Oscar E.; Cisneros Pardo Jadiel L.; Canseco Sedano Rodolfo; Montiel Palacios Felipe; Carrasco García Apolo A. 2018. Transferencia de Embriones Bovinos Criopreservados: Efecto de la Blastocentesis. Agrociencia. 52(0): 29, 22.