

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL CIENCIA ANIMAL



MANUAL DE ASPIRACION FOLICULAR EN BOVINOS

TESINA

PRESENTADA POR:
JUAN LUIS VILCHIS RAMOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISION REGIONAL CIENCIA ANIMAL



TESINA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MANUAL DE ASPIRACION FOLICULAR EN BOVINOS

TORREON, COAHUILA

JUNIO DE 2011

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISION REGIONAL CIENCIA ANIMAL



TESINA

MANUAL DE ASPIRACION FOLICULAR EN BOVINOS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

JUAN LUIS VILCHIS RAMOS

ASESOR:

**MC. JOSE LUIS FCO. SANDOVAL ELIAS
TORREON COAHUILA JUNIO DE 2011**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISION REGIONAL CIENCIA ANIMAL

TESINA

MANUAL DE ASPIRACION FOLICULAR EN BOVINOS

APROBADO POR EL COMITÉ

PRESIDENTE DEL JURADO

MC. JOSE LUIS FCO. SANDOVAL ELIAS

**COORDINADOR DE LA DIVISION REGIONAL DE CIENCIA
ANIMAL**

MVZ. RODRIGO I. SIMON ALONSO



**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL CIENCIA ANIMAL

MANUAL DE ASPIRACION FOLICULAR EN BOVINOS

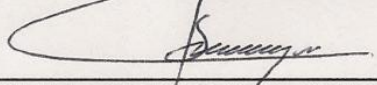
TESINA

POR
JUAN LUIS VILCHIS RAMOS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO
DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA


MC. JOSE LUIS FCO. SANDOVAL ELIAS
PRESIDENTE


MVZ. RODRIGO I. SIMON ALONSO
VOCAL


I.Z. JORGE H. BORUNDA RAMOS
VOCAL


MVZ. CUAUHEMOC FELIX ZORRILLA
VOCAL SUPLENTE

DEDICATORIA

A DIOS

Que me dio la oportunidad de vivir esta vida tan hermosa, por protegerme y cuidarme y a mi familia, mis amigos, y poder obtener y terminar mis metas e ilusiones como profesionista, gracias señor.

A MIS PADRES

SR. JUAN VILCHIS ÁLVAREZ Y

SRA. SARA RAMOS DOMÍNGUEZ

Quienes han sido un grandioso tesoro para mí, por su sacrificio, amor sincero y desinteresado, porque son y serán mi admiración, porque gracias a ellos he logrado la profesión que ahora tengo, tan anhelada para mí y para ellos, que a pesar de ser personas humildes se esforzaron para que continuara y terminara mi carrera, esperando pagarles algún día todos sus sacrificios y penas que sufrieron logrando hacer de mí un hombre de provecho, por esto y por mucho más.....Dios y la virgen de Guadalupe los bendiga siempre.

A MIS HIJAS

GIANLY SIOMARA

Y

ASHLY MICHEL

Por a ver llegado a mi vida, por hacerme tan feliz, porque ellas son mi inspiración y fuerza para seguir adelante, son la luz en mi vida.

A MIS HERMANOS:

MA. DE JESÚS

MA. ELIZABETH

LENIN

BELLA RUBÍ

MA. DE LOS ÁNGELES Q.E.P.D.

Con todo mi amor, respeto y gratitud, por ser para mí, un ejemplo por la amistad, confianza, cariño, unión y comprensión, cuyos apoyos e inspiración fueron importantes para alcanzar esta meta.

A sus esposos e hijos, para que siempre luchen por la unidad de la familia, tan fundamental para la superación de la misma.

A GUADALUPE ZARATE

Por su apoyo incondicional y por estar a mi lado durante los momentos más difíciles de mi carrera por todo esto y mucho mas gracias lupita.

AGRADECIMIENTOS

A MI ALMA TERRA MATER:

“UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO”

Por haberme dado la oportunidad de ser parte de ella y brindado los conocimientos necesarios para mi carrera por ser mi segundo hogar por esto y más te doy las gracias te doy mi “ALMA TERRA MATER”.

A MI FAMILIA:

Tías, tías, primos y primas por ser la mejor familia del mundo porque me dan un ejemplo de familia tan unida por todos los momentos tan hermosos e inolvidables que vivimos juntos les dedico este trabajo.

A PABLO ROSILLO VILLASUSO

Por haberme permitido realizar mis prácticas profesionales en su empresa por su confianza y ayudarme a profundizar mis conocimiento, por su apoyo incondicional para realizar este trabajo en NEEK biotecnología reproductiva.

RESUMEN

Las herramientas y procesos tecnológicos que el hombre aplica de manera directa o indirecta a la reproducción, en este caso animal, se conocen como biotecnologías reproductivas, o técnicas de reproducción asistida. La técnica de aspiración folicular *in vivo* u Ovum pick up (OPU) fue utilizada por primera vez en bovinos a finales de la década del ochenta y abrió nuevas perspectivas en el campo de las biotecnologías de la reproducción. Permite incrementar de forma significativa, el número de embriones transferibles y de preñeces por vaca al año, dada la posibilidad de reutilizar las vacas donantes de oocitos a intervalos mucho más cortos en comparación con la técnica de superovulación y en comparación con la utilización de ovarios de matadero. La aspiración folicular se puede realizar en cualquier momento del ciclo estral, incluso durante el inicio de la gestación, por lo que la cantidad de terneros producidos por donante y por unidad de tiempo puede ser mayor en comparación con TE.

En el presente manual se describen de forma resumida como instalar un equipo de aspiración y las precauciones que se deben de tomar en cuenta, al momento de la aspiración folicular para la obtención de oocitos de vacas donante, para la producción de embriones *in vitro*.

Palabras claves: Aspiración Folicular, Oocito, Ultrasonografía, Fecundación *in vitro* (FIV), Embriones, Ovario, Folículos, Ciclo estral.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
DEDICATORIA	I
RESUMEN.....	III
INDICE	IV
INTRODUCCION.....	1
I. ANTECEDENTES HISTORICOS	4
II. USO DE LA ASPIRACION FOLICULAR (OPU)	8
III. DESCRIPCION DE LA TECNICA DE ASPIRACION FOLICULAR (OPU).....	12
3.1 Tipo y calidad de las agujas utilizadas	16
3.2 Presión de aspiración.....	19
3.3 Transductor.....	21
IV. INSTALACION DE EQUIPO Y PROCEDIMIENTO PRÁCTICO DE ASPIRACION FOLICULAR (OPU).....	23
4.1 Limpieza del área de trabajo.....	23
4.2 Instalación del equipo de aspiración.....	24
4.3 Preparación de la pistola de aspiración	29
4.5 Preparar del pedal de la bomba de vacio	32
4.6 Preparación de la vaca	32
4.7 Cambio de tubo.....	34
V. SELECCIÓN DE DONADORAS	36
VI. SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE RECEPTORAS.....	38
VII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	40

INTRODUCCION

Las herramientas y procesos tecnológicos que el hombre aplica de manera directa o indirecta a la reproducción, en este caso animal, se conocen como biotecnologías reproductivas, o técnicas de reproducción asistida (Ángel y Bran, 2010).

Criadores para optimizar el potencial reproductivo de las vacas reduciendo el tiempo entre partos e incrementando el número anual de terneros, lo que justifica el desarrollo de biotecnologías como la multiovulación y transferencia embrionaria (MOET) o la fecundación *in vitro* (FIV) (Hidalgo *et al.*, 2002).

Los grandes avances en el área de la reproducción animal como son la fertilización *in vitro*, la clonación y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides tienen en común la necesidad de utilizar oocitos de alta calidad o capacidad de desarrollo, factor que es clave para lograr una alta eficiencia de estas biotecnologías (Nava y Hernández, 2005).

La técnica de Punción folicular *in vivo* u Ovum pick up (OPU) fue utilizada por primera vez en bovinos a finales de la década del ochenta y abrió nuevas perspectivas en el campo de las biotecnologías de la reproducción (Denis, 2008).

La tecnología de la Fertilización *in vitro* (FIV) ofrece una nueva dimensión en reproducción animal, que supera la inseminación artificial y trasplante de embriones, proporcionando al investigador una herramienta valiosa que en combinación con el trasplante de embriones, amplía las tecnologías aplicadas disponibles en reproducción animal. Esta técnica biotecnológica tiene aplicaciones inmediatas en la clonación, producción de animales transgénicos y para la producción en gran escala de embriones para el mejoramiento genético de las poblaciones bovinas (Fernández *et al.*, 1997).

La aspiración Folicular en bovinos “Ovum pick-up” (OPU), la técnica de OPU consiste en la recolección de oocitos (con ayuda de una aguja introducida por la vagina) mediante la punción de los folículos visualizados a través de un ecógrafo en hembras vivas (sin efectos dañinos en su integridad); para la producción *in vitro* de embriones y lograr la multiplicación de hembras de alto valor genético, en la cual los oocitos son colectados y posteriormente fertilizados en el laboratorio (FIV) (Denis, 2008).

La Fertilización *in vitro* (FIV) consiste en realizar una aspiración folicular a las vacas donantes, en la cual los oocitos son colectados y posteriormente fertilizados en el laboratorio. La aspiración folicular para FIV se puede realizar en cualquier momento del ciclo estral, incluso durante el inicio de la gestación, por lo que la cantidad de terneros producidos por donante y por unidad de tiempo puede ser mayor en comparación con TE. Los oocitos también pueden ser colectados de los ovarios de hembras en rastro (Arias, 2010).

Para la producción *in vitro* de embriones, la eficiencia del método de recolección y la clasificación de los oocitos son un prerrequisito. Muchos métodos tales como la aspiración del material folicular, la disección de folículos aislados individualmente los ovarios han sido descritos para obtener ovocitos inmaduros de ovarios procedentes de rastro (Hernández *et al.*, 2010).

A diferencia de transferencia convencional que Consiste en hacer superovular por medio de hormonas a las vacas donantes, y posteriormente inseminarlas con dos dosis de semen del toro seleccionado donde la Respuesta Superovulatoria (RS) puede variar dependiendo de varios factores, esta técnica tiene otras ventajas como por ejemplo no se usan hormonas, puede emplearse en animales gestantes, técnica repetible en intervalos cortos, mayor aprovechamiento del semen, posibilidad cruzamientos en un mismo trabajo, aplicable en terneras y vacas con post-parto temprano (Arias, 2010).

I. ANTECEDENTES HISTORICOS

Conviene mencionar que estas técnicas utilizadas comercialmente son muy recientes pero el esfuerzo de varios años de estudio dio como resultado la aspiración folicular para la obtención de oocitos y fertilizarlos en el laboratorio (*in vitro*) (Denis, 2008).

La técnica de punción folicular *in vivo* conocida como OPU por sus siglas en inglés (Ovum pick up) comenzó a utilizarse en la mujer en la década de 1970 y se describe por primera vez en bovinos por Pieterse *et al.* (1988). A finales de los años 1990 la técnica se había extendido vertiginosamente a numerosos países, ya que sin dudas abre nuevos horizontes en el campo de las biotecnologías de la reproducción. Actualmente se utiliza por la mayoría de los centros dedicados a la producción de embriones *in vitro* (Denis, 2008).

En 1959 nace el primer animal generado por FIV. En 1978 el primer ser humano generado por FIV, y el nacimiento del primer becerro producido por fecundación *in vitro* ocurrió en 1981. En 1986 punción transvaginal por ultrasonografía y el primer becerro nacido por OPU FIV en 1988 (Hernández *et al.*, 2010).

Antiguamente la recolección de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones provenía sólo de hembras sacrificadas u ovariectomizadas. Esta metodología presenta grandes limitaciones puesto que no permite ser reproducido, disminuyendo la producción de embriones y por tanto está limitada la posibilidad de descendencia de las hembras sacrificadas. En cambio la técnica de OPU permite la obtención de ovocitos de calidad de forma estable a partir de animales previamente seleccionados y controlados. Este procedimiento no invasivo y repetible no afecta el estado productivo y/o reproductivo ni compromete la fertilidad futura de las donantes (Denis, 2006).

La adquisición de ovocitos disponibles para la producción de embriones *in vitro* (PIV) se produce a través de la técnica de aspiración folicular transvaginal o OPU (*ovum pick up*). Desde hace más de una década la OPU ha sido la mejor opción para la recuperación de ovocitos *in vivo* en la especie bovina (Sedena *et al.*, 2005).

Previo al advenimiento de la ecografía, fueron varios los procedimientos propuestos, como la laparoscopia transvaginal o paralombar (como se muestra en la foto n° 1) permite la utilización de ovocitos de animales vivos. Presupuesto que la laparoscopia es un procedimiento quirúrgico menos cruento que laparatomía,

permitiendo la recuperación de ovocitos en novillas e incluso en los terneros, a sólo 3 semanas de edad. A pesar de las prometedoras perspectivas, las limitaciones para la laparoscopia se han enumerado por Looney *et al.* (1994). Estos autores comentaron el trabajo de la técnica, además de la aparición de fibrosis y adherencias de ovario después de su terminación. Hinrichs *et al.*, (1990) proponen la recuperación de ovocitos mediante la técnica de colpotomía, en que la punción de los ovarios es posible a través de una incisión en la parte inferior de la bolsa vaginal. Pero el riesgo de peritonitis y evisceración a través de la incisión vaginal ha limitado la expansión de este procedimiento.



Foto 1 Aspiración por laparoscopia paralombar.

Fuente: De la fuente, 2009.

La elaboración de las posibilidades de la ecografía, Callesen *et al.*, (1987) reportaron por primera vez el uso de esta técnica para obtener ovocitos bovinos, a través de la punción ovárica transcutánea en la región paralombar.



Foto 2 Aspiración quirúrgica paralombar.

Fuente: Fernández, *et al.*, 2007.

Un año más tarde, Pieterse et al. (1988), describieran la aspiración folicular por ultrasonido transvaginal que hizo posible la utilización de ovocitos bovinos, sin las limitaciones de los procedimientos existentes hasta la fecha.

II. USO DE LA ASPIRACION FOLICULAR (OPU)

La OPU como fuente estable para la obtención de ovocitos puede ser utilizada en aquellos animales que presenten problemas reproductivos, (oviductos obstruidos, metritis persistente, piometra, adherencia en cervix) animales viejos así como de animales saludables de alto valor genético que se encuentren vacías, gestantes (primer trimestre) o en el período pos partal temprano (60 días). Pueden obtenerse además ovocitos de hembras prepúberes a partir de 1-3 mes de nacidas, lo cual disminuye considerablemente el intervalo generacional (Denis, 2008).

La OPU permite incrementar de forma significativa, el número de embriones transferibles y de preñeces por vaca al año, dada la posibilidad de reutilizar las vacas donantes de ovocitos a intervalos mucho más cortos en comparación con la técnica de superovulación y en comparación con la utilización de ovarios de matadero. La aspiración folicular se puede realizar en cualquier momento del ciclo estral, incluso durante el inicio de la gestación, por lo que la cantidad de terneros producidos por donante y por unidad de tiempo puede ser mayor en comparación con TE (Palma, 2001).

La técnica permite realizar hasta dos sesiones de aspiración por donante a la semana, obteniéndose en promedio unos 4,1 ovocitos/vaca/sesión. Además, este número puede llegar a 10,4 ovocitos/vaca/sesión, si las donantes son tratadas previamente con hormona folículo estimulante (FSH) y somatotropina (bST), por lo que se pueden llegar a obtener entre 50 (sin estimulación hormonal) y 100 (con estimulación hormonal, FSH+bST) becerros por vaca donante al año. Esto representa entre 3 a 4 veces el valor logrado con la transferencia de embriones clásica. Los resultados pueden estar afectados por factores como el diámetro de la aguja de aspiración, la presión de aspiración, el momento del ciclo estral en que se realice la aspiración, edad, raza y condición corporal de la donante, así como el uso de estimulación hormonal (Peña *et al.*, 2010).

Además, la OPU permite incorporar hembras donantes que se rechazarían en los procedimientos de superovulación por razones de dificultades anatómicas en el cérvix como a una falta de respuesta o a una disminución progresiva de la respuesta al tratamiento superovulatorio. También pudiera ser que se trate de hembras que sean infértiles y que continúen vacías luego de cuatro o más servicios. No debe pasarse por alto la posibilidad de incorporar como donantes de ovocitos a hembras jóvenes e inclusive pre-púberes, lo que nos permitiría no solo acortar el intervalo generacional sino también acelerar las pruebas de progenie para la evaluación genética de sementales. Por supuesto que para esto es necesaria aún mucha investigación (Ariza *et al.*, 2006).

Es importante resaltar que el uso de esta técnica no está restringida a bovinos y ha sido aplicada en diversas especies como son equinos, rumiantes silvestres y búfalos, además de representar una herramienta importante en la recuperación de especies en peligro de extinción. Otro uso potencial de la OPU es la posibilidad de aplicar tratamientos hormonales directamente en el ovario. Tal es el caso de la inyección intraovárica del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), que permite incrementar la capacidad de desarrollo de ovocitos aspirados de ovarios de hembras pre-púberes (Rivera et al., 2000).

Además a través de estas técnicas se puede obtener lo siguiente:

- Evaluación eficiente de la capacidad fertilizante de espermatozoides y ovocitos.
- Difusión del uso de semen valioso y escaso.
- Prolongación de la vida reproductiva de animales genéticamente valiosos, inmaduros o muy viejos.
- Disminución, en cierta manera, de los costos de la aplicación de la transferencia de embriones, al hacer uso de una fuente económica e inagotable de ovocitos, provenientes de vacas eliminadas.
- Facilitación de la importación y exportación de material genético proveniente de hembras de alto valor genético.

- Desarrollo de las condiciones adecuadas para implementar otras técnicas reproductivas en el campo de la micromanipulación de embriones.
- Creación de bancos de gametos provenientes de animales seleccionados por excelencia productiva y/o adaptabilidad.
- Determinación y selección del sexo de embriones.
- Control de enfermedades de la esfera reproductiva.
- Aplicación de la transferencia de embriones en especies exóticas y en peligro de extinción

(Fernández *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que la combinación de aspiración guiada transvaginal de ovocitos combinada con la producción *in vitro* de embriones puede llegar a triplicar el número de terneros que se pueden obtener por vaca (1.5 terneros por donante por semana durante un periodo de 3 meses) Roelofsen *et al.* (1994) obtuvieron un promedio de 21.8 embriones transferibles durante un periodo de 3 meses. Cuando estos datos se expresan en forma anual, el uso de estas biotecnologías permitiría obtener un promedio de 87 embriones transferibles por vaca por año y por lo tanto eventualmente reemplazar al sistema de ovulaciones múltiples y transferencia de embriones con el que se obtienen en promedio alrededor de 25 embriones transferibles por vaca por año (Bols, 2005).

III. DESCRIPCION DE LA TECNICA DE ASPIRACION FOLICULAR (OPU)

Para la realización de OPU, resulta indispensable disponer de tres componentes: un equipo de ultrasonido (ecógrafo) con su respectivo transductor, una bomba de aspiración y un sistema de guía de aguja conectado a un tubo colector. A una presión entre 50 y 85 mm de Hg (Sedena *et al.*, 2005).

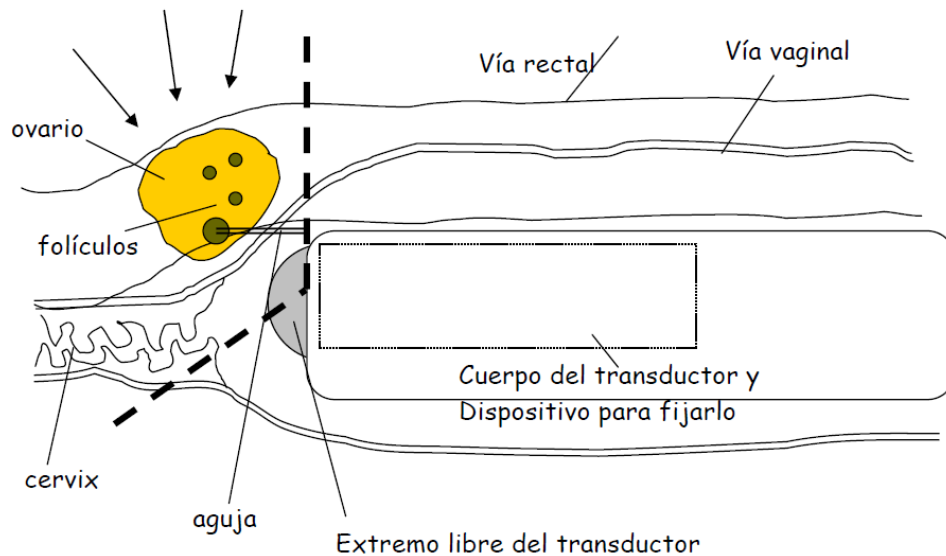


Ilustración 1 Partes y posición del transductor dentro de la vaca.

Fuente: Sedena, 2005.

Antes de iniciar el acto de la punción algunos equipos de trabajo prefieren sedar las hembras con hidrocloreto de detomidina (Domocedan) vía endovenosa, a razón de 1 mg/100 kg de peso vivo y/o (Buscopan) hyoscine-N-butylbromide o xilacina, utilizado como relajante intestinal antes de aplicar la anestesia epidural

Sin embargo, en Francia y otros países OPU se realiza de modo habitual sólo con la aplicación de anestesia epidural (5 ml de lidocaina al 2 %), de modo que, se produzca la insensibilización del aparato genital y una disminución de los movimientos peristálticos a nivel del recto, lo cual facilita tanto la localización como la manipulación de los ovarios (Nava y Hernández, 2005).

Posteriormente se extraen las heces fecales del recto y se procede a la limpieza, desinfección y secado de la vulva y la región perineal con agua, desinfectante y papel higiénico (Bols, 1997).

Una vez colocada la aguja en la guía del transductor se introduce este a través de la vagina. La cabeza del transductor debe ubicarse en cualquiera de los lados del cérvix, según sea el ovario a puncionar. Luego se introduce la mano izquierda por el recto y se fija el ovario contra la cabeza del transductor, lo que permite visualizarlo en la pantalla del equipo del ultrasonografía, al igual que a los folículos y la aguja. A su vez en la pantalla del ultra sonógrafo podemos apreciar la trayectoria de la aguja lo que nos permite ubicar los folículos para lograr una aspiración exitosa. Una vez ubicado el folículo a aspirar, se impulsa la aguja suavemente para que penetre la pared vaginal y luego la folicular; una vez logrado esto la bomba de vacío aspira el contenido y lo deposita en el filtro de embriones o en el recipiente destinado para tal fin. Posterior a esto los ovocitos son procesados

igual que para fertilización *in vitro* (Nava y Hernández, 2005). Como se ilustra a continuación.

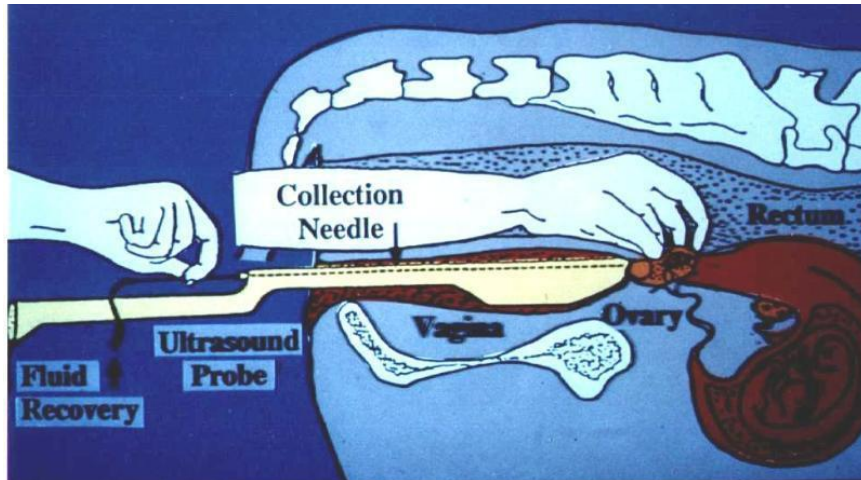


Ilustración 2 Colocación del transductor y el ovario para la aspiración folicular.

Fuente: Nava y Hernández, 2005.



Foto 3 Forma de sostener el ovario.

Fuente: Sedena, 2005.

Los folículos se observan como imágenes anecogénicas (color negro) en el ovario, es necesario hacer coincidir estos con la línea discontinua que aparece en la pantalla del ecógrafo. Como se muestra en la siguiente fotografía (Ward, 200).

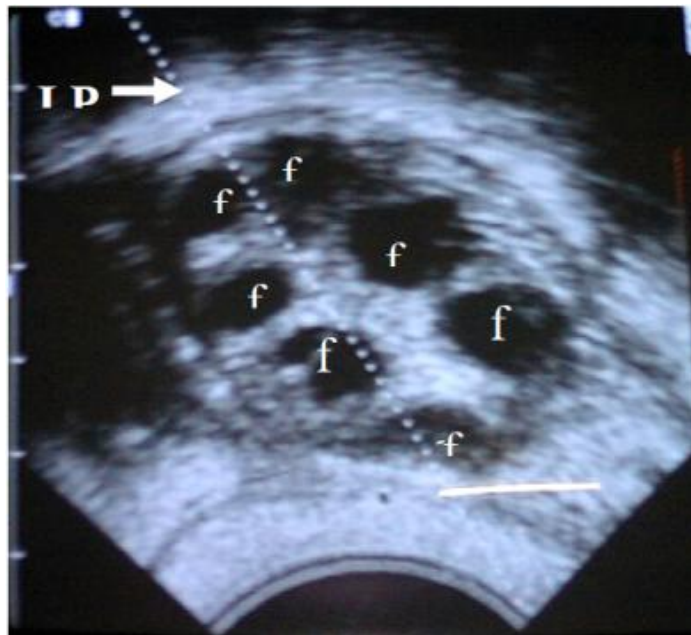


Foto 4 Folículos.

Fuente: Palma, 2001.

Antes de iniciar la operación, se hace pasar por la aguja una solución de solución fosfatada buferada (PBS) a la cual se le adiciona 0,4 % de suero de albúmina bovino (SAB) o 1 % de suero fetal (SFV) y 10 UI /ml de heparina sódica para evitar la coagulación de la sangre, que es abundante en el tubo de recolección (Alberio y Botler, 2001).

El contenido de la punción cae directamente a un filtro o a un tubo de recolección, el cual se mantiene a 37° C hasta el momento en que se procede a la búsqueda y clasificación de los oocitos colectados (Ariza *et al.*, 2006).

La competencia de los ovocitos obtenidos por aspiración transvaginal folicular no parece ser influenciada por el tamaño del folículo, pero no se da en relación a la tasa de recuperación, que ha demostrado ser significativamente más altos para los folículos inferior o igual a 4 mm, con un rango de 2-8 mm (Sedena *et. al.* 2009).

La frecuencia de OPU puede afectar a la calidad y la cantidad de ovocitos recogidos. La OPU debe ser efectuada con intervalo de 12 – 15 días, permitiéndole al donante hasta el regreso cíclico de una forma natural, no afectan la función ovárica (Arias, 2010).

3.1 Tipo y calidad de las agujas utilizadas

Calidad de las agujas y el filo que estas posean, resultan esenciales para el éxito de OPU. Existen tres tipos de agujas, las largas de uso único, las cortas de inyección (desechables) y un sistema semidesechable en el cual se cambia la punta de las agujas largas por agujas cortas desechables (Sedena *et. al.*, 2005).

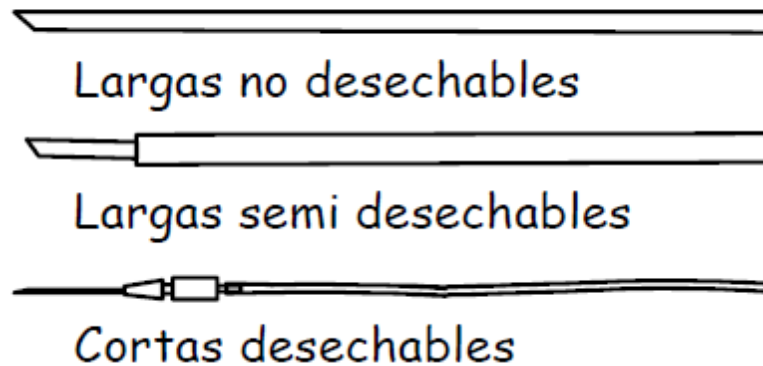


Ilustración 3 Tipos de agujas.

Fuente: Sedena, 2005.

Un gran número de investigadores recomiendan el empleo de agujas largas (35-60 cm) con diámetro exterior entre 1 y 1.5 mm, estas son relativamente fáciles de construir y manejar y tienen una vida útil prolongada, entre sus desventajas figuran sus altos precios y la pérdida con facilidad del filo y es necesario cambiarlas entre vaca y vaca, por lo que necesitan ser reafiladas regularmente, sin embargo no vuelven a recuperar su filo inicial (Denis, 2008). El ovocito debe transitar una gran distancia por una superficie metálica (Sedena *et. al.*, 2005).

Al perder el filo el bisel presenta una menor capacidad para penetrar en el ovario, lo que obliga al operador a usar más fuerza durante la punción. En esta situación, hay dos aspectos desfavorables. La primera y más grave es la posibilidad de daños al estroma ovárico, especialmente a los animales sometidos repetidamente a la técnica. El segundo aspecto se refiere a la peor recuperación de los ovocitos.

A medida que la aguja quedase romba, aumentan las posibilidades de producirse una ruptura brusca del folículo, en lugar de perforación de forma rápida y precisa. Esta abrupta caída podría afectar negativamente a la captura del ovocito desde el interior del folículo, lo que reduce la eficiencia de la técnica (Sedena *et. al.*, 2005).

Las agujas cortas son también de uso único pero muy baratas, constituyendo un sistema más práctico. Las agujas de bisel corto suelen ser más eficaces, ya que, la tasa de recolección es mayor y el daño a las células del cúmulo menor. Bols *et al.* (1997) Demostró la viabilidad de la utilización de agujas hipodérmicas desechables de 18 y 19 (G) y 50 mm de longitud. Las agujas con diámetros mayores de 18 G son relacionadas con las mayores tasas de recuperación, pero con un porcentaje mayor de ovocitos desnudo, así como importantes daños al estroma y una mayor cantidad de sangre en el líquido aspirado. Las agujas de diámetro inferior a 19 G han reducido las tasas de recuperación de ovocitos, posiblemente por la lentitud de la aspiración del líquido folicular en el momento de la punción (Chong *et al.*, 2008).

En el caso del sistema semidesechable, se han reportado daños en la calidad de los ovocitos recolectados, debido a la toxicidad de los fundentes utilizados y longitud metálica por donde debe transitar el ovocito (Bols, 2005).

Bols *et al.* (1998) diseñaron un sistema que combinó agujas desechables y su sistema de guía a un dispositivo metálico que fijaba además un transductor sectorial, todo lo cual facilitaba la operación y obtuvieron un 42% de tasa de recolección (número de ovocitos recolectados por cada 100 folículos puncionados). Este valor es influenciado por el diámetro de la aguja, la presión de aspiración y la experiencia del operador, reportándose resultados por diferentes equipos de trabajo que varían entre 7% y 69,6% en la tasa de recolección (Castilho *et al.*, 2007).

3.2 Presión de aspiración

La presión de aspiración que se alcanza en la punta de la aguja depende tanto de la presión negativa ejercida por la bomba de aspiración como del largo y ancho del sistema de tubos de recolecta y del diámetro de la aguja utilizada, por lo que resulta más aceptado expresar esta como la cantidad de fluido recolectado por minuto que en milímetro de mercurio, ya que un simple cambio en el diámetro de la aguja puede triplicar la cantidad de fluido recolectado. Este aspecto tiene gran importancia, ya que, existe una relación directa entre la presión de aspiración y la calidad de células del cúmulo intactas de éstos, dependerán los resultados que se obtengan en cuanto a maduración y capacidad futura de desarrollo embrionario (De la fuente, 2009).

Autor/es	Presión de aspiración	Diámetro de la aguja
Pieterse y col. (1988)	30-40 ml agua/min	0,8-1.0 mm IDA
van der Schans y col. (1991)	40 mm Hg	18-g
Kanitz y col. (1993)	100-400 mm Hg	No mencionado
Moreno y col. (1993)	120 mm Hg	18-g
Rath (1993)	20-60 ml agua/min	18-20-g
Fry y col. (1994)	50 mm Hg	17-g
Gibbons y col. (1994)	75 mm Hg	17-g
Kruij y col. (1994)	40-50 mm Hg	0,9 mm DIA
Looney y col. (1994)	22 ml agua/min	17-g
Scott y col. (1994)	26 ml agua/min	17-18-g
Vos y col. (1994)	4,4 ml agua/min	0,6 mm DIA
Bols y col. (1995)	36 ml agua/min	19-g
Bungartz y col. (1995)	10 ml agua/min	18-g
Stubbings y col. (1995)	no mencionado	18-g

Ilustración 4 Diferentes presiones de aspiración y diámetro de aguja.

Fuente: Bols, 1996.

Bols *et al.* (1996) compararon tres diámetros de aguja y cinco presiones de aspiración y obtuvieron las mayores tasas de recolección con las agujas de mayor diámetro (18G) independientemente de la presión de aspiración utilizada, mientras para todos tipos de agujas las mayores tasas de recolección fueron logradas al aplicar las mayores presiones de aspiración. Sin embargo, las mayores cantidades de ovocitos con cúmulos intactos se obtuvieron al aplicar presiones de aspiración menores, o sea que el número de complejos cúmulo ovocitos (COCs) intactos decreció en la misma medida en que la presión de aspiración era mayor, aumentando también el número de ovocitos desnudos, similares resultados fueron confirmados más tarde por Ward *et al.* (2000). En cuanto al diámetro de la aguja Bols *et al.* (1996) encontraron una mayor cantidad de ovocitos con cúmulos intactos y menor cantidad de ovocitos desnudos al utilizar agujas número 21 (21G) a bajas presiones.

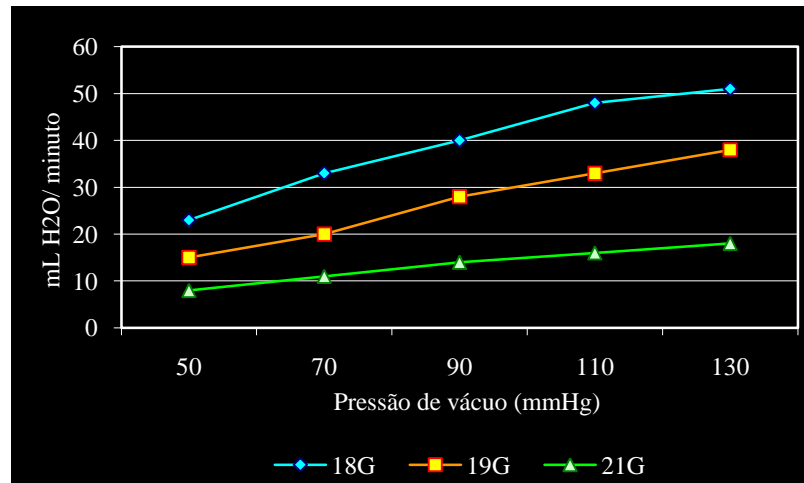


Ilustración 5 Volúmenes aspirados a diferentes presiones y nº de agujas.

Fuente: Bols, 1996.

Otro autore alcanzaron buenos resultados utilizando presiones entre 20-25 ml agua/min y 12-15 ml agua/min empleando agujas con diámetro de 20G y 19G respectivamente, mientras Argov *et al.* (2004) recomienda una presión de aspiración de 25 ml agua/min al utilizar agujas con un diámetro de 18G. (Sedena *et al.*, 2009). Relacionados con la baja presión, como 50 mm Hg, fueron ineficaces para la aspiración, mientras que más presión de 120 mm Hg dañaban el recubrimiento de cumulus oophorus (Hernández, 2001).

3.3 Transductor

La frecuencia del transductor es una variable importante en el proceso de recuperación de ovocitos. Hay citas de 3,5 MHz de frecuencia, de 7,5 MHz, 5,0 MHz y 6,5 MHz. La mayoría de los autores cita el uso de transductores convexos

o sectoriales para la aspiración folicular transvaginal. El transductor sectorial ha demostrado ser más eficiente para ver los folículos pequeños en comparación con transductor lineal. Sin embargo, el transductor lineal es sin duda el más utilizado en reproducción en animales grandes y fue posible su utilización para la aspiración folicular transvaginal. La principal desventaja de aspiración con el transductor lineal se refiere al limitado espacio entre el transductor y la aguja. La limitación de espacio impide que todas las regiones del ovario sean puncionadas, incluso para cambiar el posicionamiento de las gónadas. Obviamente, el tipo de transductores convexo proporcionar un más rápido y sencillo procedimiento. Sin embargo, la versatilidad del transductor lineal debe ser siempre considerada cuando el uso de ultrasonido no es exclusivo de OPU (Sedena *et. al.*, 2009).

IV. INSTALACION DE EQUIPO Y PROCEDIMIENTO PRÁCTICO DE ASPIRACION FOLICULAR (OPU)

4.1 Limpieza del área de trabajo

- Limpieza del área: limpiar la mesa donde se va a colocar el equipo (ultrasonido y bomba de vacío) la limpieza se realiza con un desinfectante de preferencia alcohol y toallas de papel.



Foto 5 Limpieza y desinfección del área donde se colocara el equipo.

4.2 Instalación del equipo de aspiración

-Colocar la bomba de vacío sobre la mesa, esta debe estar ubicado de tal manera que el aspirador pueda observar la presión de la bomba, conectar la fuente de energía.

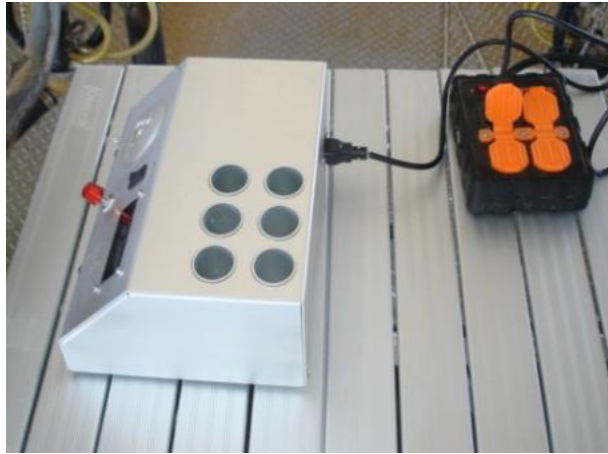


Foto 6 Bomba de vacío conectada.

- Colocar el ultrasonido sobre la mesa de trabajo conectar la fuente de energía, ubicar el ultrasonido donde el aspirador pueda observar la pantalla perfectamente.



Foto 7 ultrasonido y bomba de vacío conectadas.

-Conectar la manguera de vacío con la bomba de vacío.



Foto 8 Manguera de vacío conectada a la bomba de vacío.

- Conectar el transductor con el ultrasonido y colocarlo atrás de este.



Foto9 Conexión del transductor.



Foto 5 Transductor colocado atrás del ultrasonido.

- A un tubo para aspiración folicular de 50 ml se le coloca el tapón de vacío. Posteriormente, a este tapón se le coloca la manguera de vacío (en el extremo opuesto al que está conectado con la bomba de vacío).



Foto 11 Manguera de vacío conectada con el tapón de vacío.

-Instalar la guía de aspiración, colocar un extremo al tapón de vacío, y el otro extremo pasar por la varilla de aspiración y conectarla con la punta de la varilla de aspiración.



Foto 12 Guía de aspiración conectada al tapón de vacío.



Ilustración 13 Guía de aspiración pasando por la varilla de aspiración.

Precaución: Asegurarse que la guía quede unos 3 cm dentro del tubo y que la punta este en contacto con la pared del tubo, para que el contenido resbale por la pared del tubo.

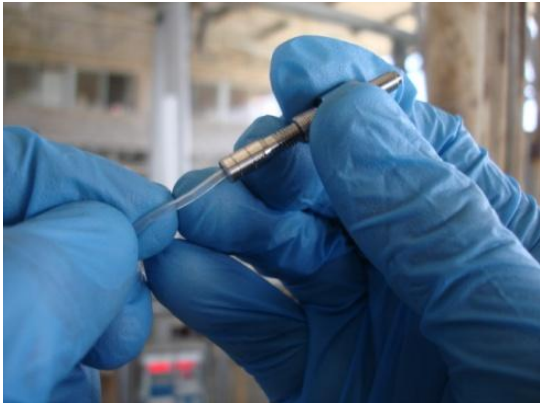


Foto 14 Pasar la guía de aspiración por el tornillo de seguridad.

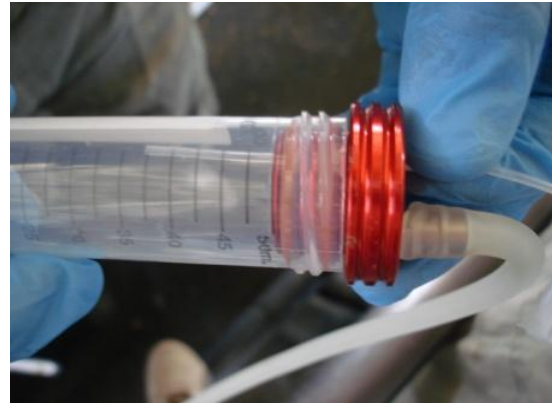


Foto 6 Guía de aspiración 3 cm dentro del tubo y pegado a la pared de este.

- Conectar la punta con la varilla de aspiración y colocar la aguja de aspiración (18 G por 1.5”), buscando siempre que la guía de aspiración embone perfectamente con la aguja para evitar fuga del contenido de aspiración

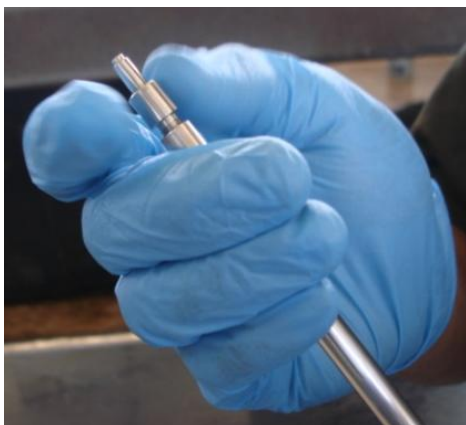


Foto 16 Colocación de la punta de la varilla de aspiración.



Ilustración 17 aguja de aspiración perfectamente colocada en la varilla de aspiración.

Precaución: De preferencia no tocar las puntas de la guía de aspiración para evitar que esta se contamine.

-Colocar la varilla dentro de la pistola de aspiración y asegurarla con el tornillo.

Precaución: evitar que la punta de la aguja salga de la pistola de aspiración para que esta no se contamine. El bisel de la aguja debe estar dirigida hacia abajo en relación a la marca de la varilla de aspiración.



Foto 18 Varilla dentro de la pistola de aspiración.

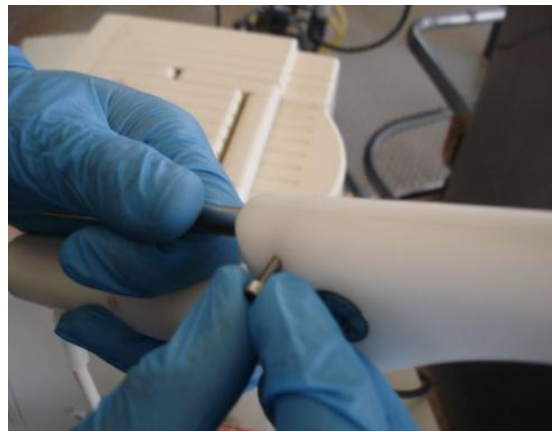


Foto 7 Tornillo de seguro de la pistola de aspiración.

-Encender la bomba de vacío y el transductor; colocar los tubos de 150 ml dentro de la bomba incluyendo los que contienen el medio de enjuague.



Foto 20 Bomba de vacío encendida y los tubos colectores.

-Ajustar la presión de la bomba de vacío a 90 mm hg.



Foto 21 Ajuste de la presión de la bomba de vacío.

4.3 Preparación de la pistola de aspiración

-voltear una camisa de aspiración y poner un poco de gel transparente por dentro y dispersarlo por la punta de la camisa de aspiración.

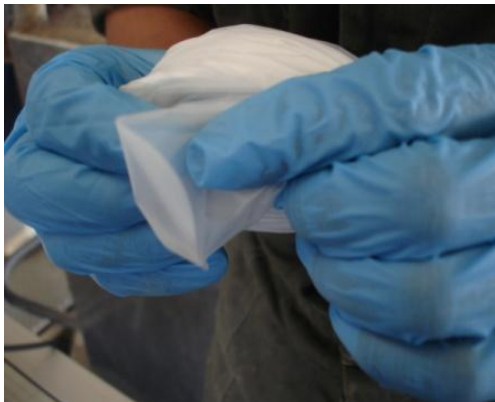


Foto 22 Doblado la camisa de la pistola de aspiración para ponerle gel.



Ilustración 23 Gel lubricante en la parte de adentro de la camisa.



Foto 24 Dispersar el gel por toda la punta de la camisa antes de colocarla en la pistola de aspiración.

Precaución: Evitar tocar la punta por la parte de adentro de la camisa para no contaminarla.

-Colocar la camisa en la pistola de aspiración.

Precaución: evita que quede aire en la punta de la pistola para no alterar la calidad de la imagen.



Foto 25 Colocación de la camisa en la pistola de aspiración.

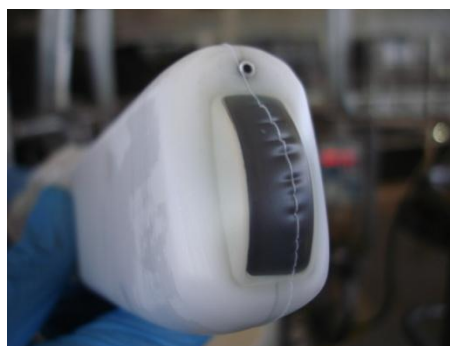


Foto 26 Evitar que quede aire en la punta de la pistola.

- Poner un poco de gel transparente en la punta de la pistola y colocar detrás del ultrasonido.



Foto 27 gel para lubricar la punta de la pistola de aspiración.



Foto 8 Colocación detrás del ultrasonido.

4.4 Preparación de la anestesia

-Preparar lidocaína al 2% de 5 a 10 cm (dependiendo de la talla de la vaca) en un jeringa de 10 cm con una aguja de calibre 18 G por 1 o 1.5", y colocarlo sobre el ultrasonido de modo que esté al alcance del aspirador.

La jeringa debe llenarse cada que sea utilizada para que el aspirador siempre pueda disponer de anestesia.



Foto 29 Preparación de la anestesia.



Foto 9 Colocar la jeringa llena sobre el ultrasonido.

4.5 Preparar del pedal de la bomba de vacio

-El pedal de la bomba debe colocarse dentro de un guante de nitrilo y de uno de palpación de este se modo evitar que le entre humedad que lo pueda dañar y dejarlo al alcance de pie del aspirador.



Foto 31 Protección del pedal de la bomba de vacío.



Foto 10: Pedal en 2 guantes de protección.

4.6 Preparación de la vaca

Meter y asegurar la vaca en el chut, que la vaca quede al alcance de la pistola de aspiración.



Foto 33 Asegurar la vaca en el chut.

-Limpiar la vaca, sacar el excremento para poder trabajar con el aparato reproductor.

-Aplicar anestesia epidural. (Lidocaína al 2%).



Ilustración 34 Anestesia epidural.

-Posteriormente lavar con agua limpia la vulva y secar con toallas de papel.



Foto 35 Lavado del área de la vulva.

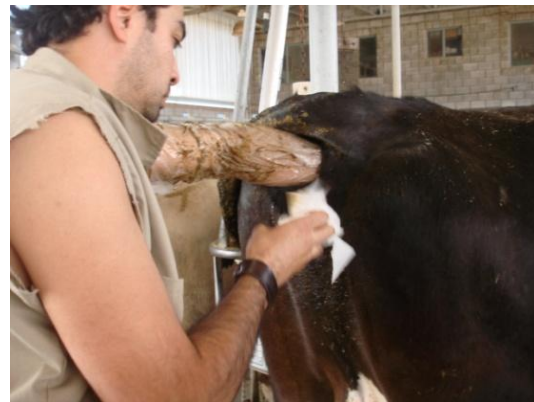


Foto 36 Secado del área de la vulva.

Introducción de la pistola de aspiración dentro de la vagina e inicio de la aspiración folicular, el ayudante abre la vulva para evitar que la pistola se contamine al entrar en la vaca.



Foto 37 Introducción de la pistola de aspiración.

4.7 Cambio de tubo

-Al momento de terminar de aspirar cada vaca, se retira el tubo del tapón de aspiración y se coloca un tubo limpio.

Precaución: Este paso se debe de realizar en el menor tiempo posible y con mucho cuidado para evitar contaminar los tubos.



Foto 38 Cambio de tubo colector.

-El tubo con el contenido de la aspiración debe taparse rápidamente y envolverse con una toalla de papel para cubrirlo de los rayos solares; Mandarlo inmediatamente al laboratorio donde se hace la búsqueda y clasificación de los oocitos.



Foto 39 Cubrir el tubo con papel.

V. SELECCIÓN DE DONADORAS

Óptimos resultados reducirán costos por lo cual la selección de la donadora es un evento crítico del cual depende gran parte del éxito del programa. A continuación enumeramos algunos de los criterios y características importantes para escoger una donadora de embriones (Peña *et al.*, 2010).

- 1.- Linaje (pedigree), registro genealógico, premiaciones en pista (belleza y caracterización racial)
- 2.- Comportamiento individual superior en características de importancia económica, crías superiores a la media del hato. Especialmente comparados con sus medios hermanos (hijos del mismo toro).
- 3.- Producción (carne o leche) según la raza.
- 4.- Tener buena salud reproductiva en general: ciclos estrales regulares y que hayan comenzado a temprana edad, dos o menos servicios por concepción en años anteriores, intervalo entre parto.
- 5.- Ningún problema al parto o irregularidades reproductivas (retención o metritis)
- 6.- Ningún defecto genético o de conformación detectable

7.- Estar en edad reproductiva: bos taurus: mínimo 18 meses y máximo 14 años,
bos indicus: mínimo 22 meses y máximo 13 años.

8.- Docilidad.

9.- Historia de buena respuesta al tratamiento hormonal

10.- Libre de enfermedades infecciosas o adquiridas: brucela, leucosis, ibr, dvb,
leptospira, campylobacteriosis, *trichomoniasis*, etc

11.- Palpación cérvix, útero, ovarios, vaginoscopia

12.- Ecografía ovárica

Toda precaución es poca

(Peña *et al.*, 2010).

Las donadoras deben estar con buena condición corporal, preferiblemente fuera de lactancia (seca), vacas con deficiencia nutricional crónica no responden adecuadamente a tecnologías reproductivas, es muy común que cuando tratamos donadoras el problema la mayoría de las veces es la obesidad, situación que también compromete mucho los buenos resultados. Por lo que se recomienda evitar trabajar con esas dos categorías de animales (Peña *et al.*, 2001).

VI. SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE RECEPTORAS

Para los programas de transferencia de embriones, se debe realizar una detallada selección de las hembras que van a prestar su vientre (receptoras), con el fin de obtener las mayores tasas de preñez posibles. Los animales a ser usados como receptoras deben cumplir con los siguientes parámetros de selección (Ariza *et al.*, 2006).

1. Valor zootécnico – fenotipo y posible habilidad materna preferencia f1 cebú con razas lecheras
2. Edad y peso- de acuerdo a la raza novillas de 18 a 24 mese con peso minimo de 300 kg o primíparas.
3. Fertilidad – buenas condiciones reproductivas, cíclicas y sin trastornos reproductivos
4. Anatomía del sistema reproductivo adecuados para TE (ovarios, cervix, cuernos etc.)
5. Estado nutricional – evitar novillas o vacas gordas o con acumulos de grasa o deficiencia s nutricionales cronicas.
6. Sanidad
7. Libres de enfermedades infecciosas o adquiridas.
8. Chequeo ginecológico

9. Chequeo clínico
10. Medicina preventiva
11. Pruebas del kit reproductivo: Leucosis, brucelosis, ibr, dvb, leptospira, trichomona, campylobacter, sarcosporidium, adicionalmente aftosa, tuberculosis, etc.
12. Cantidad: 8 a 10 receptoras/donadoras seleccionadas.
13. La selección previa al trasplante.
14. Cuerpo lúteo (cl3) de excelente calidad.
15. Condiciones uterinas normales.

(Ariza *et al.*, 2006).

VII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Alberio, R., Butler, H. 2001. Sincronización de los celos en hembras receptoras. En: Biotecnologías de la Reproducción. Ed. Palma. 2ª ed. Pp 61 - 77.
2. Ángel D, Bran JA. 2010. Reproducción asistida en equinos: nuevos aportes desde la teoría. Rev. Ces. Med. Vet. Zootec. 5(1): pág. 56-69.
3. Arias, M. G. 2010. Comparación técnica y económica de dos técnicas de mejoramiento genético: Transferencia de Embriones (TE) y Fertilización *in vitro* (FIV) en la hacienda El Trébol, Santa Cruz, Bolivia. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 13 p.
4. Ariza, Luis Edgardo, Camacho, Wilson, Serrano-Novoa César . 2006. Evaluación retrospectiva de la tasa de preñez obtenida por transferencia de embriones en diferentes bovinos en el municipio de Puerto Araujo, Santander, Colombia. REDVET 1695-7504, Vol. VII, nº 04.
5. Bols, G.A., Bergfelt, D.R., Mapletoft, R.J.1996. Manipulación de la dinámica folicular en el ganado bovino: su aplicación en programas de transferencia de embriones. En: II Simposio Internacional de Reproducción Animal. Cordova, Argentina. p.53-64.
6. Bols, P.E.J. 1997. Transvaginal Ovum Pick-Up in the cow: Technical and Biological Modifications, Ph.D. Thesis. University of Ghent, Ghent, Belgium.

7. Bols, P.E.J. 2005. Puncture of mature ovarian follicles in bovine assisted reproduction. *Verhandeligen Van de Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van Delgie LXVII* nr. 3, blz. 177-202.
8. Callesen H., Greve T. Christensen F. 1987. Ultrasonically y guided aspiration of bovine follicular oocytes. *V. 27*, pág. 217.
9. Castilho C., Assis G. S., Garcia J. M. 2007. Influência do diâmetro e da fase folicular sobre a competência *in vitro* de oócitos obtidos de novilhas da raça Nelore. *Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.2, p.288-294.
10. Chong M., Denis R., Emilia R., Lliteras, Gallego C., Fuentes D., Pérez A. y del Valle C. 2008. Efecto de la estimulación intraovárica con ecg sobre la población folicular y la recolección de ovocitos por punción *in vivo*. La Habana, Cuba. *Ciencia y Tecnología Ganadera Vol. 2 No. 1*, p. 39-41.
11. De la Fuente. 2009. Reproducción asistida en el vacuno de leche. Selección y superovulación. Córdoba, España. Instituto nacional de investigación y tecnológica agraria y alimentaria.
12. Denis R. 2008. Aspiración folicular individual *in vivo*(OPU) una nueva perspectiva en el campo de las biotecnología de la reproducción. En. *Ciencia y tecnología ganadera, La Habana cuba, vol. 2 n°. 2*, pág. 57-70.
13. Denis, R.G. 2006. Obtención de ovocitos por punción folicular *in vivo* (ovum pick-up) guiada por ultrasonografía en vacas del genotipo Siboney de Cuba. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. La Habana Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical.

14. Fernández Adriana, Bastida Pedro y Troconiz Juan. 1997. Fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de vacas cebú postmortem. Aragua, Venezuela. Archi. Latinoamericano producción animal 5 (supl 1), pág. 324-325.
15. Fernández Adriana, Días Thais y Muños Gladys. 2007. Producción *in vitro* de embriones. Caracas, Venezuela. Rev. Fac. Cs Vets. UCV. 48 (1), pág. 51-60.
16. Hernández Fernández Adirno, Nava Trujillo Héctor y Vílchez Venuslira. 2010. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración *in vitro*. Zulia Venezuela. Vol.3 n°. 1, pág. 41-44.
17. Hernández Fonseca H. 2001. Fertilización *in vitro*. En: Reproducción Bovina. C González- Stagnaro (Ed). Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. Cap. XXVI: 411-426.
18. Hidalgo C. O., fernandez I., Duque P., Facal N., Diaz E., Prendes J. M., Menendez J., Gomez E., Prieto L. y Diez C. 2002. Primeros terneros producidos *in vitro* tras puncion ecoguiada de folículos ováricos. Gijon, España. Arch. Zootec. 51: pág. 411-422.
19. Hinrichs, K., Kenney, D.F., Kenney, R.M. 1990. Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. V. 34, pág. 107-112.
20. Looney, C. R., Lindsey, B. R., Gonseth C. L., Johnson, D.L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. V. 41, pág. 67-72.

21. Mucci N, Aller J F, Kaiser G G, Hozbor F, Alberio R H. 2006. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. Arch. Med. Vet. 38, N° 2.
22. Nava T. Héctor y Hernández F. Hugo. 2005. Aspiración folicular transvaginal. Maracaibo, Venezuela. Pag. 611-614.
23. Palma, G.A. 2001. Producción *in vitro* de embriones bovinos. En: Palma, G.A ed. Biotecnología de la Reproducción. Buenos Aires: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). p.225-294
24. Peña Miguel, Velásquez José, Velásquez Guillermo, Flórez Hernando, Cardozo Jaime. 2010. El papel de las donadoras, de las receptoras y de los detectores de celo (machos y hembras) en la superovulación y transferencia de embriones.
25. Pieterse, M. C., Kappen K. A., Kruij, Th. A.M., Taverne, M.A.M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. V. 30, n. 04, pág. 751-762.
26. Rivera R. M., Block J., Paula Lopes F. F., Al-Katanam Y. M., Drost M. y Hansen P. J. 2000. Preparación de embriones producidos *in vitro* para la transferencia a receptoras. Departamento de ciencia animal y clínica de grandes especie, Universidad de Florida.
27. Sedena M. M., Fernández da Silva K. C., Costantino M. M., Garbelini G. R., Aires L.L., y Fortes P. J. L. 2005. Aspiración de ovocitos por ultrasonografía transvaginal y producción de embriones. Brasil. Central de biotecnología, Morgi Mirim, sp.

28. Seneda M.M., Esper C.R., Andrade E.R., Binelli M., Max M.C., Oliveira J.A. y Garcia J.M. 2005. Relationship between follicle size after FSH treatment and efficiency of oocyte recovery. *Anim. Reprod.*, v.2, n.3, p.178-182.

29. Ward, F.A., Lonergan, P., Enright, B.P Boland, M.P. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocyte for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technologic. *Theriogenology* 54:33-46.