



01674

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**MONITOREO ULTRASONOGRÁFICO DEL DESARROLLO Y
MORTALIDAD EMBRIONARIA EN GANADO BOVINO
DEL TRÓPICO HÚMEDO**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

AGUSTÍN MANUEL ROSILES VÁZQUEZ

TUTOR:

CARLOS S. GALINA HIDALGO

COMITÉ TUTORAL:

JAVIER DE JESÚS VALENCIA MÉNDEZ

EUGENIO VILLAGÓMEZ AMEZCUA

MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A Dios.

A mis padres: María de Jesús y Agustín, por brindarme su apoyo incondicional y absoluto durante esta vida que me han regalado, de la cual he aprendido casi todo.

A mis hermanos: Claudia, Teresa, Mercedes y David que siempre me han ayudado en los momentos decisivos de mi vida.

Para mi profesión: que me ha dado tantas satisfacciones como enseñanzas y de la cual he disfrutado también el placer de convivir con la naturaleza.

“Sólo es útil el conocimiento que nos hace mejores”

Sócrates.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Galina, no sólo por el gran apoyo ofrecido para la realización de este proyecto, sino también, por motivarme a ser un profesional responsable y de garra en mi vida personal.

Al Departamento de Reproducción de la FMVZ-UNAM, y con él a sus profesores: Joel Hernández, Antonio Porras, Carlos Gutiérrez, Arantza Lassala, Lucy Rangel, Javier Valencia y Rosa Páramo, gracias por su amistad, ayuda y consejos.

A la Dra. Teresa Sánchez y al Dr. Eugenio Villagómez, por sus aportaciones como parte de mi comité tutorial en la finalización de mi tesis.

Para la Universidad Nacional Autónoma de México, con mucho cariño para su Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y sus Centros de Enseñanza e Investigación.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana, mi *Alma Mater*, que me forjó como profesional. En especial a los Doctores Felipe Montiel, Carlos Lamothe, Víctor Gregorio, Patricia Álvarez y Antonio Hernández.

Al Instituto Tecnológico de Costa Rica, sede regional San Carlos, por las facilidades otorgadas durante este proyecto, con particular afecto para el Doctor Rafael Molina.

Al Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Ganadería Tropical de la FMVZ-UNAM. Gracias Dr. Pulido por su valiosa ayuda y amistad en el proyecto.

Al CONACYT, por su confianza en los alumnos del posgrado.

Como parte de la carrera profesional las amistades juegan un papel clave para su óptimo desempeño, aportando su tiempo y confianza que nos inducen a elevar nuestra calidad como seres humanos.

Con mucho agradecimiento para los Doctores Arturo Olguin y Susana Rojas, por extenderme su mano desde mi arribo y que aún la mantienen firme.

A los Doctores Ignacio Crespo, Patricia Arriola, Araceli Loyo, Salvador Morales e Ing. Emilio Trujillo, por su apreciada ayuda durante mi carrera.

A la Doctora Martha Barrón y Miguel A. Garduño, ángeles y amigos que me trataron como parte de su familia.

A mis buenos amigos sin fronteras: Cynthia y Lasse, los llevo en mi corazón.

Ahora sí, a mis compañeros de maestría y excelentes amigos: Brenda Salgado, Martín Maquívar, Nicolás Valenzuela, César Solórzano, Adriana Verduzco, Paulina Dávila, Margarita Robledo, Ivonne Granados, Paulo Fetter, de su personalidad aprendí demasiado. Juan, Ramón, Shendel, Bety, Toño, Alejandro, Henry, Dudú, Liliana, muchísimas gracias por su amistad.

Gisel, muchas gracias por tu ayuda y amistad.

“El encanto de la vida depende únicamente de las buenas amistades que cultivamos”

Tarafa.

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis esté disponible para cualquier tipo de intercambio bibliotecario.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'A' followed by 'M', 'R', and 'V' in a cursive script, ending with a horizontal line.

MVZ Agustín Manuel Rosiles Vázquez

ÍNDICE

RESÚMEN	VII
ABSTRACT	IX
CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo General	5
CAPÍTULO 2	
REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1. DIAGNÓSTICO PRECOZ DE GESTACIÓN	6
2.1.1. Palpación Rectal	6
2.1.2. Análisis de Progesterona	8
2.1.3. Ultrasonografía	10
2.2. MUERTE EMBRIONARIA	16
2.2.1. Muerte embrionaria temprana	16
2.2.2. Muerte embrionaria tardía	23
CAPITULO 3	
MATERIALES Y MÉTODOS	26
CAPITULO 4	
RESULTADOS	29
CAPITULO 5	
DISCUSIÓN	31
CAPITULO 6	
REFERENCIAS	37

CAPITULO 7

CUADROS Y FIGURAS

CUADRO 1. Porcentaje de precisión para la detección de la vesícula embrionaria, embrión y latido cardiaco.	50
CUADRO 2. Escala de crecimiento embrionario entre el día 20 y 40 de gestación en ganado <i>B. indicus</i> del trópico húmedo.	51
FIGURA 1. Incremento en el tamaño de la vesícula embrionaria entre el día 20 y 40 de gestación en ganado <i>B. indicus</i> .	52
FIGURA 2. Desarrollo embrionario longitudinal.	53
FIGURA 3. Desarrollo embrionario transversal.	54
FIGURA 4. Comparación entre el desarrollo promedio de la vesícula embrionaria y tres casos de muerte embrionaria.	55
FIGURA 5. Comparación entre el desarrollo longitudinal promedio y tres casos de muerte embrionaria.	56
FIGURA 6. Comparación entre el desarrollo transversal promedio y tres casos de muerte embrionaria.	57

RESÚMEN

AGUSTÍN MANUEL ROSILES VÁZQUEZ. **MONITOREO ULTRASONOGRÁFICO DEL DESARROLLO Y MORTALIDAD EMBRIONARIA EN GANADO BOVINO DEL TRÓPICO HÚMEDO.** (Dirigido por: Carlos S. Galina Hidalgo)

El estudio del desarrollo embrionario mediante ultrasonografía en las primeras etapas de gestación ha sido estudiado básicamente en ganado de la raza Holstein bajo las condiciones del altiplano, sin embargo, en ganado Cebú criado bajo las condiciones del trópico húmedo no existe información al respecto que caracterice de forma confiable el desarrollo embrionario en este tipo de ganado. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue medir el tamaño de la vesícula amniótica, el eje longitudinal y transversal del embrión para caracterizar su desarrollo y de esta forma determinar el día en que es posible observar el latido cardiaco en los embriones monitoreados. Mediante ultrasonografía transrectal (Equipo Aloka SSD 500 microplus, transductor lineal de 7.5 MHz) se realizó un total de 267 observaciones a un grupo de 50 hembras, la mayoría de ellas del tipo *Bos indicus* gestantes, a partir del día 20 hasta el 40 post-inseminación artificial bajo las condiciones del trópico húmedo. La precisión para detectar la vesícula amniótica dentro del útero fue del 60% (12/20) en el día 20 del primer monitoreo, midiendo esta última una longitud promedio de 0.44 ± 0.20 cm. Dentro de estas vesículas se confirmó la presencia de un embrión mediante el análisis retrospectivo de los monitoreos. Asimismo, la precisión para detectar al embrión fue de 66.6% y 100% entre los días 20 y 24 post-servicio, respectivamente. La longitud promedio de los embriones al día 20 fue de 0.20 ± 0.07 cm y de forma transversal midió en promedio 0.07 ± 0.02 cm. La exactitud para detectar el latido cardiaco fue del 50% (9/18) en el día 24 post-servicio y para el día 26 la precisión se incrementó al 100%. Al final del monitoreo (día 40), el embrión midió de forma longitudinal y transversal en promedio 1.92 ± 0.24 cm y 0.85 ± 0.11 cm, respectivamente. En el presente estudio se observaron tres casos de muerte embrionaria entre los días 30-36 de gestación con dos días de diferencia entre

cada uno. En conclusión, la detección de un embrión es posible a partir del día 24 post-inseminación artificial y el latido cardíaco a partir del día 26 con un 100% de confiabilidad.

Palabras clave: ultrasonografía, diagnóstico de gestación, trópico húmedo, *B. indicus*.

ABSTRACT

AGUSTIN MANUEL ROSILES VAZQUEZ. **ULTRASONOGRAPHIC SCREENING OF MORTALITY AND EMBRYO DEVELOPMENT IN CATTLE RAISED UNDER HUMID TROPIC.** (Directed by: Carlos S. Galina Hidalgo).

There is no information on embryo development in Zebu cattle monitored through ultrasonography, most of the studies are related to Holstein cows. Due to the above, the objective was to measure the size of the amniotic vesicle and the longitudinal and transversal axis of the embryo, in order to determine the day in which it is possible to measure this structure and to detect the heart beat in the screened embryos. Through a transrectal ultrasonography (Aloka SSD 500 microplus equipment, linear transducer of 7.5 MHz) a total of 267 observations were performed in a group of 50 females mainly *Bos indicus*, raised under humid tropical conditions and pregnant from day 20 every second day until day 40 post-artificial insemination. The accuracy to identify the amniotic vesicle was 60% (12/20) on day 20 of the first screening, measuring an average length of 0.44 ± 0.20 cm. Accuracy to detect the embryo was 66.6% and 100% between days 20 and 24 post-breeding, respectively. The mean length of the embryos on day 20 was of 0.20 ± 0.07 cm and the transversal shape had a mean length of 0.07 ± 0.02 cm. The accuracy to detect the heart beat was 50% (9/18) on day 24 post-breeding and for day 26 the accuracy increasing to 100%. At the end of the screening (day 40), the embryo measured a mean of 1.92 ± 0.24 cm and 0.85 ± 0.11 cm, longitudinal and transversally respectively. In the present study, we observed three cases of embryonic mortality between days 30-36 of pregnancy with two days of difference between one to another. In conclusion, the embryo can be detected from day 24 post-artificial insemination and the heart beat from day 26 with 100% reliability.

Key words: ultrasonography, pregnancy diagnosis, humid tropic, *B. indicus*.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

La exactitud en el diagnóstico precoz de gestación es un factor esencial para optimizar el desempeño reproductivo en el ganado bovino (Szenci *et al.*, 1998). Por tal motivo, la importancia económica en el diagnóstico exacto de gestación ha resultado en el desarrollo de diversas técnicas para este propósito (Chaffaux *et al.*, 1986). De esta forma, el examen clínico del útero por medio de la palpación rectal ha sido la técnica más utilizada para el diagnóstico de gestación en el ganado bovino (Oltenacu *et al.*, 1990). La gran ventaja que ofrece la palpación rectal radica en su bajo costo, mientras que la precisión depende de la experiencia del clínico y los criterios utilizados como son la fluctuación del útero, la identificación de la vesícula amniótica y el desplazamiento de la membrana corio-alantoidea (Pieterse *et al.*, 1990). Debido a las características anatómicas del útero entre las diferentes edades se recomienda el diagnóstico de gestación por medio de la palpación rectal a partir del día 32 a 36 en novillas y en vacas entre el día 36 a 42 después de la inseminación artificial (IA) o monta natural (Roberts, 1986). Como desventajas se pueden citar tres muy importantes, en primer lugar no es posible realizar el diagnóstico precoz de gestación que ayude a disminuir el intervalo después del primer servicio (Fricke, 2002), en segundo lugar, la palpación del útero por vía rectal no es una herramienta práctica que determine la viabilidad de los embriones (Fissore *et al.*, 1986), por último, se ha propuesto que la palpación rectal antes del día 45 post-IA o monta natural puede incrementar el riesgo de mortalidad embrionaria, especialmente cuando se utiliza como método de diagnóstico el desplazamiento de membranas (White *et al.*, 1989).

Al respecto, se han realizado diversas investigaciones (Kastelic y Ginther 1989; Alexander *et al.*, 1995) con el fin de evaluar los posibles efectos detrimentales de la palpación rectal sobre la viabilidad del embrión, así como también para evaluar el grado de precisión en el diagnóstico precoz de gestación

(Galland *et al.*, 1994). De esta forma, los estudios realizados divergen en los resultados obtenidos. Por ejemplo, Alexander *et al.* (1995) concluyen que la palpación rectal no ejerce ningún efecto negativo sobre la viabilidad de los embriones si se realiza a partir del día 30 a 60 post-IA, incluso utilizando como método de diagnóstico el desplazamiento de membranas. Sin embargo, según Franco *et al.* (1987) la palpación rectal puede tener efectos negativos sobre la viabilidad de los embriones provocando la reabsorción de los mismos, por ser una técnica invasiva que afecta el ambiente uterino (Boyd *et al.*, 1988). Con respecto al grado de precisión, Galland *et al.* (1994) consideran que aún con un técnico experimentado, la palpación rectal es virtualmente absoluta desde el día 33 post-servicio, teniendo que confirmar el diagnóstico al día 60 de gestación.

Por otra parte, desde los 70's en la industria lechera donde se tienen registros de la fecha de monta o inseminación artificial las pruebas para medir la concentración de progesterona (P_4) en leche y sangre para realizar el diagnóstico de gestación han sido muy precisas. El objetivo inicial en la medición de los niveles de P_4 fue caracterizar la fase lútea del ciclo estral y determinar la duración del mismo (Bulman y Lamming, 1979). Posteriormente, al identificar un cuerpo lúteo (CL) activo mediante los niveles de P_4 , se planteó su utilización para realizar el diagnóstico de gestación. Sin embargo, al medir las concentraciones P_4 y obtener resultados con niveles basales de la misma, el diagnóstico de gestación se convierte realmente en un diagnóstico de no gestación. Por ejemplo, Booth *et al.* (1979) al medir la concentración plasmática de P_4 como un indicador en el diagnóstico precoz de gestación en ganado de carne y utilizando como referencia el umbral de 1.50 ng/ml de P_4 , obtuvieron una precisión de 77.8% para el diagnóstico de gestación y 93.8% para el de no gestación. En estudios similares se han obtenido diversos niveles plasmáticos de P_4 en un intento por determinar el umbral preciso que ratifique el diagnóstico de gestación en ganado Cebuino (Pulido *et al.*, 1991). De esta forma, han existido errores al diagnosticar como no gestantes animales en los cuales el umbral de P_4 es inferior al planteado en los

protocolos de investigación. Otra limitante que se presenta al evaluar únicamente la presencia de un CL como un indicador de gestación cuando se desconocen las fechas de servicio, radica en el hecho de que existen fases lúteas prolongadas que pueden proporcionar falsos positivos al interpretar los resultados de P_4 (Bulman y Lamming, 1977), incluso, los niveles circulantes de esta hormona pueden estar presentes en enfermedades como la piometra (Manns *et al.*, 1985), lo cual puede confundir el diagnóstico de gestación cuando se interpretan únicamente los niveles de progesterona.

Con el fin de evaluar el método de mayor eficacia para el diagnóstico de gestación precoz, Pieterse *et al.* (1990) compararon el Radioinmunoanálisis (RIA), Enzimoimmunoanálisis (EIA) y la Ultrasonografía; concluyendo que esta última es la técnica más adecuada para el diagnóstico precoz de gestación ya que se aprende rápidamente y se dispone de los resultados de forma inmediata. Los porcentajes de sensibilidad obtenidos fueron 97.7%, 93.1% y 86.2% mediante Ultrasonografía, EIA y RIA, respectivamente. Posteriormente, Szenci *et al.* (1998) para realizar el diagnóstico precoz de gestación en vacas lecheras compararon tres métodos (ultrasonografía, proteína B bovina específica de la gestación y glicoproteína 1 asociada a la gestación), y concluyeron que no existían diferencias estadísticas significativas entre los métodos antes mencionados y el porcentaje de vacas que llevaron a término la gestación. Sin embargo, los resultados obtenidos al día 26 post-IA demuestran que la ultrasonografía superó con un 94.5% de especificidad a la proteína B bovina específica de la gestación (85.1%) y a la glicoproteína 1 asociada a la gestación (56.7%). Estos datos demuestran que mediante la ultrasonografía es posible identificar animales gestantes de forma precisa 26 días después de realizado el servicio.

Si bien, el uso de proteínas específicas de la gestación y los análisis de P_4 tanto en leche como en sangre proporcionan valiosa información para integrar el diagnóstico de gestación, tienen como limitante que los reactivos y el equipo de laboratorio para estas pruebas poseen un alto valor económico, se requiere de personal técnico especializado y los resultados se obtienen a mediano plazo

(Gandy *et al.*, 2001). En adición, no es posible confirmar la existencia de un embrión viable basados únicamente en los niveles de progesterona, ya que el incremento de estos últimos puede estar presente en fases lúteas prolongadas, piometras y en menor porcentaje durante los cuerpos lúteos persistentes (Manns *et al.*, 1985; Inskeep, 1995).

Debido a lo anterior, se han desarrollado técnicas que permiten no solamente identificar la existencia de un CL funcional durante la gestación, sino que también evalúan el desarrollo y viabilidad de los embriones. De esta forma, las primeras investigaciones realizadas por Pierson y Ginther (1984) para monitorear el desarrollo embrionario dieron la pauta para extender el campo de estudio de la ultrasonografía en el ganado bovino. Por ejemplo, Baxter y Ward (1997) al utilizar la ultrasonografía para realizar el diagnóstico precoz de gestación y monitorear la mortalidad embrionaria, determinaron que esta técnica por sí misma no produce riesgos sobre la viabilidad de los embriones. Además, se confirmó que la ultrasonografía es una técnica mucho menos invasiva que la palpación rectal (Boyd *et al.*, 1988) y puede proporcionar en animales gestantes hasta un 100% de precisión cuando el diagnóstico se realiza 20 días después del primer servicio (Curran *et al.*, 1986^a).

El diagnóstico precoz de gestación y estudio del desarrollo embrionario mediante ultrasonografía ha sido realizado básicamente en ganado Holstein de clima templado en los sistemas de producción intensivos (Pierson y Ginther, 1984; Curran *et al.*, 1986^a; Chaffaux *et al.*, 1986; Fissore *et al.*, 1986). Bajo estas condiciones experimentales ha sido posible evaluar el desarrollo embrionario mediante las características que determinan la edad de gestación y viabilidad de los embriones (Kastelic *et al.*, 1988). Asimismo, Curran *et al.* (1986^b) tipificaron una curva de crecimiento para evaluar el desarrollo embrionario en ganado de la raza Holstein, realizando el monitoreo a partir del día 10 hasta el día 60 post-IA, donde las principales variables analizadas fueron las dimensiones del embrión y sus características anatómicas como son la presencia del latido cardiaco, área

ocular y miembros torácicos y pélvicos. En contraste, bajo las condiciones extensivas del trópico húmedo la información referente al desarrollo y mortalidad embrionaria en ganado *Bos indicus* es escasa, ya que no existen referencias al respecto. No obstante, se ha reportado de forma indirecta en ganado sujeto a condiciones de estrés calórico que la velocidad de desarrollo y calidad de los embriones recolectados ha sido deficiente (Hernández-Cerón *et al.*, 2004), lo cual permite suponer que bajo las condiciones del trópico húmedo la velocidad de crecimiento embrionario puede ser diferente comparado con el ganado Holstein sujeto a las condiciones del altiplano. Sin embargo, se esperaría que al extrapolar los datos referentes al crecimiento embrionario del ganado *Bos taurus* los resultados fuesen similares en el ganado *B. indicus*, a pesar de ello, se hace necesario tener un conocimiento preciso del desarrollo embrionario en ganado Cebú criado bajo las condiciones del trópico húmedo.

Por tal motivo, evaluar el desarrollo embrionario en programas de IA o monta natural bajo las condiciones extensivas del trópico húmedo utilizando como instrumento de medición la escala del ganado *B. taurus* podría, no necesariamente ser comparable dadas las características del ganado *B. indicus*.

1.1. Objetivo General

Caracterizar mediante ultrasonografía el desarrollo embrionario entre el día 20 y 40 de gestación en ganado *B. indicus* de clima tropical.

1.2. Objetivos específicos

1. Medir el desarrollo del embrión para determinar la edad de gestación.
2. Tipificar las características embrionarias que pueden ser observadas mediante ultrasonografía.
3. Caracterizar la naturaleza de la posible muerte embrionaria a través de la ultrasonografía.

CAPITULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. DIAGNÓSTICO PRECOZ DE GESTACIÓN

2.1.1. Palpación Rectal

A nivel mundial, la palpación rectal continúa siendo la herramienta práctica de manejo reproductivo más utilizada para realizar el diagnóstico de gestación en ganado bovino (Oltenacu *et al.*, 1990). La palpación precisa de las estructuras anatómicas del ovario es fundamental para identificar el estatus reproductivo de la vaca y así realizar el programa reproductivo apropiado. Es por ello, que los estudios realizados para determinar el grado de precisión que la palpación rectal proporciona cuando se identifican las estructuras ováricas convergen en un 85% de precisión aproximadamente (Gutiérrez *et al.*, 1996; Ribadu *et al.*, 1994). Sin embargo, una de las principales limitantes que más afecta su efectividad cuando se realiza el diagnóstico precoz de gestación radica en el tiempo post-servicio en que ésta es realizada. Por ejemplo, en los programas de IA o monta natural es común que el diagnóstico de gestación a través de la palpación rectal se realice a los 40 días post-servicio, teniendo que realizar un diagnóstico confirmatorio aproximadamente 60 días después de finalizado el programa (Amiridis *et al.*, 2000; Nation *et al.*, 2003; Chebel *et al.*, 2004). El objetivo final que pretenden los programas de reproducción (IA ó monta natural) es obtener el mayor índice de fertilidad mediante el protocolo utilizado y como un reflejo de ello incrementar las tasas de gestación. Sin embargo, cubrir el mayor número de hembras después del primer servicio depende en parte, de la eficiencia para detectar la mayor cantidad de hembras vacías en el siguiente celo. Desafortunadamente, el diagnóstico de gestación por medio de la palpación rectal no proporciona la información oportuna

que permita identificar hembras vacías en el siguiente celo post-servicio, y por consiguiente disminuir el intervalo entre servicios (Fricke, 2002).

Por tal motivo, evaluar la eficiencia que la palpación rectal puede proporcionar en el diagnóstico precoz de gestación ha sido tema de estudio en la investigación veterinaria. Por ejemplo, estudios clásicos (Archibong y Diehl, 1982) han reportado que mediante la palpación rectal es posible obtener 100% de precisión cuando el diagnóstico se realiza entre los días 40 y 75 post-IA. Posteriormente, Franco *et al.* (1987) obtuvieron un 82.3% de precisión mediante esta técnica realizando el diagnóstico entre los días 42-46 posteriores al servicio. No obstante, aunque la precisión en el diagnóstico de gestación gira alrededor del 100%, la rentabilidad se basa en identificar animales no gestantes de forma inmediata para reincorporarlos de nuevo al programa reproductivo (Galland *et al.*, 1994). Asimismo, Oltenacu *et al.* (1990) diseñaron un modelo para analizar el costo-beneficio que diversos esquemas pueden proporcionar cuando se realiza el diagnóstico precoz de gestación. Así, encontraron que el diagnóstico por medio de la palpación rectal en el día 40 de gestación redituaba económicamente una ganancia neta de \$3.80 dólares por vaca. De la misma forma, concluyeron que el método más rentable se hallaba realizando análisis de P_4 en leche en el día 19 posterior al servicio seguido de la administración de $PGF_{2\alpha}$ 10 días después de colectadas las muestras. Mediante este esquema obtuvieron una ganancia neta de \$10.50 dólares por vaca. Sin embargo, para lograr estas ganancias económicas es indispensable lograr una eficiencia $\geq 20\%$ en la detección de celos.

Es por ello, que el diagnóstico precoz de gestación entre los 18 y 24 días post-servicio es virtualmente imposible mediante la palpación rectal cuando se desconocen las fechas de monta o IA, incluso aún cuando se realiza con un técnico experimentado (Kelton *et al.*, 1988).

2.1.2. Análisis de Progesterona

A principios de los 70's se propuso como un método para realizar el diagnóstico precoz de gestación la medición de los niveles de P₄ (Robertson y Sarda, 1971; Laing y Heap, 1971). Así, los esfuerzos realizados a nivel mundial llevaron a los investigadores a determinar qué tipo de muestras son específicas para medir las concentraciones de esta hormona. Es por ello, que desde sus inicios los análisis han sido realizados en muestras colectadas de sangre y leche principalmente, en ambos casos con resultados que han ayudado a integrar el diagnóstico de gestación (Bulman, 1979; Eastman, 1979; Booth *et al.*, 1979). En sus inicios, uno de los principales objetivos al medir las concentraciones de P₄ fue para caracterizar la fase lútea del ciclo estral en el ganado bovino y de esta forma comparar su precisión *versus* la palpación rectal y la ultrasonografía. De esta forma, las investigaciones realizadas por Ribadu *et al.* (1994) y Gutiérrez *et al.* (1996) reportaron una correlación del 85% entre los análisis de P₄, palpación rectal y la ultrasonografía en la identificación de estructuras ováricas que determinan la fase lútea del ciclo estral en la vaca.

Los primeros análisis de laboratorio para cuantificar las concentraciones hormonales fueron realizados mediante técnicas de RIA, posteriormente, con el desarrollo de las técnicas inmunológicas de Bioquímica y sin sustituir al RIA, el EIA fue adoptado como una técnica más para medir los niveles hormonales. El principio básico que utilizan ambas técnicas se basa en anticuerpos específicos que reaccionan contra la hormona en estudio; la diferencia radica que mediante el RIA se utilizan radioisótopos para la marcación del complejo antígeno-anticuerpo (Rioux y Rajotte, 2004). Con el objetivo de realizar el diagnóstico precoz de gestación, Thirapatsukun *et al.* (1978) midieron los niveles plasmáticos de P₄ en ganado de carne entre el día 17 y 20 post-IA. De esta forma, obtuvieron 93.8% de precisión en el diagnóstico exacto de gestación cuando utilizaron el umbral de 1.50 ng/ml de P₄. Asimismo, observaron que el umbral de 2.00 ng/ml de P₄ (positivo de gestación), desafortunadamente aumentaba el porcentaje de falsos negativos, lo

cual adquiriría cierta desventaja al definir el umbral preciso que confirmara correctamente el mayor porcentaje de diagnósticos positivos. Posteriormente, Franco *et al.* (1987) utilizaron vacas lecheras para medir la concentración de P₄ en muestras de leche. Los investigadores obtuvieron 100% de precisión cuando el primer muestreo se realizó entre los días 20-24 post-IA. Sin embargo, este porcentaje disminuyó (72.9%) cuando las muestras fueron colectadas entre los días 28-42 post-servicio. En ambos casos, la concentración de P₄ que confirmaba como positivo el diagnóstico de gestación en cada muestra fue >0.5 ng/ml, lo cual afectó el segundo muestreo ya que los perfiles hormonales de algunas vacas no obtuvieron este umbral. Es por ello, que independientemente del tipo de muestra colectada (leche o sangre), el protocolo para los análisis de laboratorio debe establecer con precisión qué perfiles hormonales pueden determinar el diagnóstico correcto de gestación (Nebel, 1988). Asimismo, elegir qué tipo de muestra utilizar para medir los niveles de P₄ depende de diversos factores. Por ejemplo, las muestras de leche se obtienen básicamente de ganado lechero, donde la disponibilidad para su colección se favorece de acuerdo a las condiciones de manejo, por el contrario, las muestras de sangre se obtienen principalmente en ganado de carne, donde las prácticas de manejo disminuyen de forma considerable en comparación con los sistemas de producción lecheros (Rioux y Rajotte, 2004). Otro factor decisivo para llevar a cabo los análisis de P₄ se basa en tener registros confiables de las fechas de monta o IA, de no ser así, las muestras colectadas pueden coincidir con una fase lútea del ciclo estral y tener como resultado falsos positivos al interpretar el diagnóstico de gestación (Waldmann *et al.*, 2001). Infelizmente, no todos los sistemas de producción bovina cuentan con registros reproductivos, a excepción principalmente, de los sistemas intensivos de producción lechera. Además, según Pennington *et al.* (1981), los niveles de P₄ en leche pueden variar considerablemente de acuerdo al tipo de raza utilizada, días de gestación y el tiempo que transcurre durante la colección de las muestras hasta el análisis de las mismas. Por último, como parte de los protocolos de investigación en los cuales se miden los niveles de P₄ para realizar el diagnóstico

de gestación, es necesario que se utilice la palpación rectal para realizar el diagnóstico confirmatorio entre los 40 y 60 días después del primer servicio. Desafortunadamente, al medir los niveles de P₄ y confirmar como gestante a una hembra con base en ello, existe la posibilidad de que las concentraciones de esta hormona empiecen a disminuir debido probablemente a una muerte embrionaria (Lulai *et al.*, 1994; Franco *et al.*, 1987), de esta forma, identificarla como no gestante dependerá del tiempo en que se realice el diagnóstico confirmatorio (Stevenson *et al.*, 2003).

2.1.3. Ultrasonografía

Con el desarrollo de la ultrasonografía de tiempo real y su aplicación en el campo de la Medicina Veterinaria a finales de los 70's ha sido posible el estudio del aparato reproductivo en grandes especies. Los primeros ensayos fueron realizados para el diagnóstico precoz de gestación en equinos (Valon *et al.*, 1981; Palmer y Driancourt, 1980), posteriormente, esta técnica comenzó a utilizarse para el diagnóstico de gestación y estudio del desarrollo embrionario en novillas (Pierson y Ginther, 1984). Asimismo, se ha utilizado en los programas de transferencia de embriones para visualizar, cuantificar y monitorear el desarrollo folicular necesario para evaluar la respuesta a los esquemas de ovulación múltiple (Pierson y Ginther, 1988). Es así, como la ultrasonografía se ha convertido en una importante herramienta para la investigación y asimismo se ha integrado en la clínica y programas reproductivos de ganado bovino (Pierson *et al.*, 1988).

La detección de animales gestantes de forma precoz motivó el interés de los investigadores para determinar el grado de precisión que puede proporcionar la ultrasonografía. Con respecto a la exactitud en el diagnóstico precoz de gestación mediante la localización del embrión y la vesícula embrionaria se han realizado diversas investigaciones. Al respecto, Curran *et al.* (1986^a) utilizando un grupo de novillas Holstein para realizar el diagnóstico precoz de gestación,

obtuvieron una precisión del 20% en la detección de la vesícula embrionaria en el día 10 post-IA. Más tarde, Boyd *et al.* (1988) lograron visualizar la vesícula al día 9 post-IA con una precisión del 30% en un grupo de vacas de la misma raza. En general, existe un incremento en los porcentajes de precisión para la detección de la vesícula embrionaria conforme avanza la edad de gestación (Curran *et al.*, 1986^b).

Con relación a la exactitud en el diagnóstico precoz de gestación mediante la localización del embrión propiamente dicho, la divergencia en los resultados reportados por los diferentes investigadores se ha reducido. Por ejemplo, Hanzen y Delsaux (1987) registraron 94% de precisión en el diagnóstico precoz de gestación basados en 320 exámenes a partir del día 24 hasta el 81 post-IA. Posteriormente, Hughes y Davies (1989) reportaron un 100% de precisión cuando las observaciones se realizaron en el día 28 post-IA utilizando animales de dos años de edad. Kastelic *et al.* (1989) utilizando un grupo de novillas bajo condiciones controladas reportaron 100% de exactitud en el diagnóstico precoz de gestación entre el día 20 y 22 post-IA. Más tarde, los porcentajes de precisión de Pieterse *et al.* (1990) disminuyeron al registrar un 81% entre el día 21 y 33 de gestación. Una vez que los investigadores realizaron el diagnóstico precoz de gestación mediante la ultrasonografía con un elevado índice de confianza entre los 20 y 25 días posteriores al servicio, el interés se orientó en determinar la precisión para detectar el latido cardiaco, que es finalmente lo que determina la viabilidad de los embriones (Kastelic y Ginther, 1989). Al respecto, Pierson y Ginther (1984) utilizaron un grupo de novillas en las cuales detectaron el latido cardiaco entre el día 26 y 29 post-IA, reportando una precisión del 100%. Más tarde, Curran *et al.* (1986^a) disminuyeron el tiempo en el cual se detectó el latido cardiaco, reportando una precisión del 100% en el día 21 post-IA. En contraste, no todas las investigaciones muestran el mismo nivel de precisión, ya que Totey *et al.* (1991) en su estudio detectaron escasamente un 26% de precisión en el día 22 post-IA. Es por ello, que Badtram *et al.* (1991) analizaron los diversos factores que pueden tener algún efecto sobre los porcentajes de precisión cuando se realiza el

diagnóstico precoz de gestación mediante la ultrasonografía. En su análisis, concluyeron que la experiencia del operador, el número de partos y edad de la hembra no ejercen ningún efecto sobre la precisión en el diagnóstico, pero sí puede variar de acuerdo a las características del equipo ultrasonográfico, refiriéndose específicamente al tipo de transductor utilizado.

Principios básicos de la ultrasonografía (Pierson *et al.*, 1988)

La ultrasonografía utiliza ondas de sonido de alta frecuencia que producen imágenes de los tejidos blandos y órganos internos, de forma similar a la que un sonar es utilizado para proyectar la superficie del océano. El origen de las ondas del transductor ultrasonográfico es similar al sonido audible de las ondas emitidas por un tambor. En estado de reposo, existe un equilibrio entre las moléculas de aire de cada lado del tambor (sonido audible) o entre las moléculas de los cristales eléctricos del transductor y los tejidos con los cuales está en contacto (ultrasonido). Cuando el tambor es golpeado las moléculas de aire de cada lado del tambor se comprimen alternativamente y se refractan por las vibraciones. De forma similar, cuando un pulso de corriente eléctrica se aplica a los cristales del transductor, se producen las vibraciones de los mismos resultando en ondas de presión acústica (ultrasonido) en los tejidos contiguos. Las ondas de sonido son dirigidas a través de los tejidos por el movimiento del transductor o variando el ángulo como sea deseado. Los tejidos tienen la característica de propagar o reflejar las ondas de sonido a diferentes grados. El haz de sonido transmitido el cual es reflejado y recibido por los mismos cristales del transductor se convierte en impulsos eléctricos que son visualizados en la pantalla del ultrasonido como una serie de puntos grises.

Las características de los tejidos determinan la proporción del haz de sonido que será reflejado. La parte reflejada es presentada en la imagen ultrasonográfica por tonos de color gris, que pueden variar desde negro hasta blanco. Los líquidos no reflejan las ondas de sonido, estas imágenes se

denominan no ecogénicas o anecoicas. Por otra parte, los tejidos densos reflejan gran parte del haz de sonido, apareciendo en la pantalla de color blanco, estas imágenes se denominan ecogénicas o hiperecoicas. Otros tejidos pueden visualizarse en diferentes tonos de color gris dependiendo de su capacidad para reflejar las ondas de sonido. Algunos equipos de ultrasonografía muestran de 16 a 64 tonos diferentes en la escala de color gris. El haz de sonido que pasa a través de los tejidos es completamente delgado (2 mm), mostrando a los tejidos en una especie de cortes histológicos.

Al igual que un sonido audible, la onda puede debilitarse o atenuarse. Un eco de la misma frecuencia y velocidad es producido si la primera onda de sonido emitida golpea una barrera, esto es suficiente para que el sonido regrese. Las ondas del ultrasonido viajan a través del cuerpo a una velocidad aproximada de 1540 m/seg hasta que el tejido reflector es alcanzado. Algunas ondas se reflejan y regresan a los cristales, otras continúan para interactuar en la profundidad de los tejidos. El eco que regresa comprime los cristales eléctricos, los cuales en cambio producen energía eléctrica la cual es transmitida hacia un receptor.

Equipo

El poder de resolución del equipo depende de la frecuencia de las ondas de sonido. La frecuencia se refiere al número de vibraciones por segundo de la fuente acústica. Una alta frecuencia proporciona gran detalle en la imagen pero menor penetración, mientras que una baja frecuencia proporciona gran penetración de los tejidos pero menor detalle en la imagen. Las frecuencias ultrasonográficas están medidas en megahertz (MHz; 1 MHz = 1,000,000 de ondas de sonido por segundo). Con un transductor de baja frecuencia una gran área puede ser observada, pero con menos detalles. En cambio, con un transductor de alta frecuencia una pequeña área puede ser visualizada, pero con mayor nitidez. Los transductores de baja frecuencia (3.0 – 3.5 MHz) son utilizados principalmente para observar grandes estructuras a una gran distancia del transductor, por

ejemplo, un feto de gran tamaño. Los transductores de alta frecuencia (5.0 – 7.5 MHz) se utilizan con el propósito de estudiar con detalle las estructuras cercanas al transductor (evaluación de los ovarios y del útero), este equipo es el de mayor utilización vía transrectal para los exámenes del aparato reproductivo en grandes especies.

Los equipos de ultrasonografía utilizados para el examen del aparato reproductivo en el bovino son “scanners” de tiempo real, modo B. El modo B se refiere a la claridad, en donde la imagen ultrasonográfica se muestra de forma bidimensional representada por puntos. La claridad de los puntos es proporcional a la amplitud en la que regresan los ecos. La imagen de tiempo real se refiere al movimiento *in vivo*, en el cual los ecos son registrados y actualizados continuamente. Existen dos tipos básicos de ultrasonidos de tiempo real modo B disponibles en el mercado: “scanners” lineales y sectoriales. En el scanner lineal, las ondas de sonido son emitidas perpendicularmente a través del transductor entre las filas de cristales. Las ondas producidas por cada cristal viajan paralelamente hacia el cristal vecino en un orden lineal. La imagen producida es rectangular, el ancho de la imagen corresponde a la longitud de la parte activa del transductor. Las imágenes de los tejidos cercanos al transductor aparecen en la parte superior de la pantalla. La sección que se observa generalmente es un plano sagital con respecto al cuerpo. Las imágenes de los tejidos en el extremo del transductor pueden aparecer del lado derecho o izquierdo del monitor; dependiendo del diseño del scanner. Los scanner sectoriales producen imágenes en forma de “rebanadas de pastel”, el uso típico de estos scanner en el campo de la medicina veterinaria es para imágenes de tendones en los miembros de los equinos, y estructuras torácicas y abdominales de pequeñas especies.

Producción de imágenes

La calidad de la imagen que se busca en los exámenes ultrasonográficos del aparato reproductivo es el producto de varios componentes electrónicos, los

cuales deben funcionar en armonía para producir las imágenes. El transductor debe estar en íntimo contacto con los tejidos, conectado a la consola por una sonda compuesta de varios cables que se conectan de forma individual a los cristales que pulsán y reciben ondas. El generador de pulsos envía señales electrónicas hacia los cristales eléctricos a un ritmo predeterminado, el cual causa la formación de ondas ultrasonográficas. El ritmo de los pulsos está calculado de forma que la imagen observada en la pantalla se muestre continuamente. El alcance total de todos los cristales que conforman el transductor produce una imagen o marco. De esta forma, cada segundo aparece un índice de 20 a 30 imágenes en el monitor; es así como se produce la imagen de tiempo real. La imagen se mueve conforme cambia la localización de las estructuras (ejemplo, el latido cardíaco del embrión) o conforme el transductor se coloca sobre otros tejidos.

Los ecos que regresan de los tejidos son capturados electrónicamente por un receptor, en este último la señal es amplificada y se realiza una compensación por disminución de la intensidad. Posteriormente, la señal amplificada se dirige hacia el convertidor de scanner donde es almacenada y por último se muestra el resultado de la imagen en una pantalla o monitor. El convertidor de scanner también sincroniza el ritmo de las ondas del transductor para que la imagen producida se observe de forma armónica en el monitor.

2.2. MUERTE EMBRIONARIA

Las pérdidas prenatales como la muerte embrionaria (ME) y fetal son las causas más importantes de los fracasos reproductivos en ganado bovino, teniendo un impacto sustancial en la rentabilidad de la producción animal (Vanroose *et al.*, 2000). De esta forma, aunque los índices de fertilidad pueden llegar a ser en promedio del 70% en ganado de carne (Breuel *et al.*, 1993) y del 76% en ganado lechero (Sartori *et al.*, 2002), se ha estimado que la ME ocurre aproximadamente entre el 20 y 40% del ganado bovino (Hanzen *et al.*, 1999) y en el caso de la muerte fetal se han reportado índices que oscilan entre el 5 y 8% (Thurmond *et al.*, 1990; Chagas *et al.*, 2002).

Según el Comité de Nomenclatura en Reproducción (1972), un embrión es considerado como tal después de la fertilización hasta el completo estado de diferenciación, esto es, aproximadamente al día 42 de gestación. Con base en esta clasificación, la muerte embrionaria temprana ocurre antes del reconocimiento materno de la gestación, esto es, antes de los días 15-17 del ciclo en el ganado bovino, asimismo, la muerte embrionaria tardía ocurre a partir del rescate del cuerpo lúteo hasta el completo estado de diferenciación embrionaria (Humblot, 2001). La ventaja biológica que produce la muerte embrionaria temprana radica en que la presentación del siguiente estro se llevaría a cabo en promedio 21 días después del estro anterior, sin afectar un ciclo normal, dando la oportunidad a la hembra de volver a quedar gestante (Fricke, 2002).

2.2.1. Muerte embrionaria temprana

Según Whates (1992) la mayor parte de las pérdidas embrionarias ocurren durante los primeros días post-fertilización y durante el proceso de implantación del embrión. El estudio de la muerte embrionaria temprana se ha realizado básicamente mediante dos métodos; evaluación de embriones recolectados en etapas tempranas de su desarrollo y la medición de los niveles plasmáticos de P₄

que integran el diagnóstico precoz de gestación. De esta forma, Diskin y Sreenan (1980) al evaluar la calidad de los embriones recolectados al día 8 post-IA en un grupo de novillas, observaron un 90% de fertilización, sin embargo, al continuar la recolección de los embriones en el día 12 y 16 post-IA, observaron un 37 y 27% de mortalidad embrionaria, respectivamente. Posteriormente, Dunne *et al.* (2000) utilizando un grupo de vaquillas de carne para evaluar los índices de mortalidad embrionaria temprana recolectaron embriones en el día 14 post-IA, así, asumiendo índices de fertilización del 90% según lo publicado por Diskin y Sreenan (1980), reportaron pérdidas embrionarias del 22% con base en la calidad y el número de embriones recolectados. Por último, Humblot (2001) al realizar una revisión de literatura sobre las frecuencias de la muerte embrionaria temprana encontró índices situados entre el 20% y 43%, con base en estudios de campo, los cuales combinaron los resultados de las mediciones de P₄ y el porcentaje de animales que retornaron al estro.

Etiología de la muerte embrionaria temprana

Las investigaciones realizadas a nivel mundial convergen en el sentido de que los principales factores que propician las pérdidas embrionarias pueden ser de tipo genético, nutricional, hormonal, ambiental, y el estado de salud del animal, incluso se han dividido en dos grandes categorías; como causas infecciosas y no infecciosas (Vanroose *et al.*, 2000). Estos factores pueden presentarse de forma individual o interactuando entre ellos.

Factores genéticos

Las anomalías cromosómicas son consideradas como una fuente de mortalidad embrionaria en el ganado bovino (Zavy, 1994). King (1990) estimó que estas anomalías pueden acontecer hasta en un 20% del total de las pérdidas embrionarias y fetales. Una de las principales aberraciones cromosómicas

descritas en especies domésticas en la translocación Robertsoniana 1/29 del ganado bovino, la cual consiste en la pérdida del centrómero del cromosoma 29 y la retención por parte de éste último del centrómero del cromosoma 1, teniendo como consecuencia la inactivación de ambos cromosomas (Iannuzzi *et al.*, 1992). A través de este fenómeno se reduce la fertilidad en el ganado debido a la muerte embrionaria que se tiene como consecuencia (Wilson, 1990).

Factores nutricionales

La condición corporal ha demostrado ser útil para el calcular el estado nutricional y predecir como se refleja este último en los índices de fertilidad del ganado bovino (Hady *et al.*, 1994). Asimismo, el balance energético negativo puede afectar el estado nutricional y por consiguiente reducir la fertilidad en el ganado (Beam y Butler, 1999). Para demostrar que el estado nutricional deficiente tiene un efecto directo sobre la calidad del ovocito y por consiguiente este último comprometer el desarrollo embrionario, Butler y Smith (1989) utilizando vacas lecheras de alta producción, observaron que el balance energético negativo antes del parto afecta la calidad del ovocito hasta el momento del servicio. De esta forma aunque el ovocito sea fertilizado el bloqueo de la poliespermia puede fracasar, desarrollándose el embrión de forma anormal muriendo en los siguientes días post-fertilización (Zavy, 1994). Quintans *et al.* (2004) utilizando ganado de carne con baja condición corporal y destete temporal, estimularon la ovulación múltiple mediante la administración de FSH; los autores observaron como respuesta a su objetivo principal que el número y tamaño de folículos monitoreados fue deficiente, y aunque indujeron la ovulación de los folículos con GnRH, reportaron que la calidad de los embriones recolectados fue baja, debido a la deficiente condición corporal de los animales.

Por otra parte, el incremento del potencial genético para la producción láctea ha sido asociado como una causa en la disminución de la fertilidad en ganado lechero (Butler *et al.*, 1996). Esto se debe en parte a que el aumento de la

producción láctea y el consumo de materia seca en este tipo de ganado son estimulados en respuesta al incremento en el consumo de proteína suministrada por la dieta (Butler, 1998). De esta forma, Elrod y Butler (1993) diseñaron un experimento para determinar si el exceso de proteína en la dieta tenía algún efecto sobre el pH uterino y por consiguiente afectar el desarrollo embrionario. A través de su investigación mostraron que las novillas con niveles plasmáticos de nitrógeno ureico $\geq 16\text{mg/dL}$ tuvieron porcentajes de fertilidad 30% inferiores con respecto a las novillas en las cuales los niveles fueron $< 16\text{mg/dL}$, pues observaron que el pH uterino normal disminuyó de 7.2 a 6.6. De esta forma, concluyeron que altas concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico disminuyen el pH uterino y por consiguiente pueden comprometer el desarrollo embrionario.

Alteraciones endocrinas

Al igual que en otras especies domésticas, existe un requerimiento absoluto de la progesterona para el mantenimiento de la gestación en el ganado bovino. Se ha reportado que la insuficiencia primaria del cuerpo lúteo (CL) para síntesis de P_4 causa ME (Whates, 1992). Al respecto, la insuficiencia lútea se ha dividido en dos categorías básicas: la primera categoría incluye al CL el cual tiene una vida media corta (7-14 días), y la segunda categoría incluye al CL de vida media normal pero con una marcada disminución en la secreción de P_4 (Gaverick y Smith 1986). De esta forma, la vida del CL durante el periodo crítico del reconocimiento materno de la gestación depende de las señales embrionarias para su mantenimiento. Básicamente, la producción del interferón Tau (IF- τ) alrededor del día 12 (Farin *et al.*, 1990) es esencial para llevar a cabo el mantenimiento de la gestación, aunque los mayores niveles del IF- τ se registran entre el día 15 y 17. Sin embargo, se ha reportado que algunas de las pérdidas embrionarias se deben a la incapacidad del embrión para suprimir la cascada luteolítica durante el periodo crítico del reconocimiento materno de la gestación (Thatcher *et al.*, 2001).

Por otro lado, una de las principales hormonas que intervienen en la síntesis de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ es la oxitocina, la cual es medida para evaluar el efecto de su administración exógena sobre los porcentajes de gestación, Lemaster *et al.* (1999) aplicaron a partir del día 5 hasta el día 8 post-IA dosis comerciales de oxitocina y observaron que los porcentajes de gestación fueron del 33% en el grupo tratado, mientras que en el grupo testigo fueron del 80%. Así, suponen que las concentraciones circulantes de esta hormona en etapas tempranas del desarrollo embrionario estimularon la síntesis de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, llevándose a cabo la lisis del CL y por ende la muerte embrionaria temprana.

Agentes infecciosos

Vanroose *et al.* (2000) al realizar una revisión de literatura sobre la ME y las interacciones embrión-patógenos señalaron que la atención primaria de estas pérdidas embrionarias está enfocada hacia los agentes infecciosos específicos. Debido a ello, las infecciones uterinas específicas son causadas principalmente por virus, bacterias y protozoarios que ingresan al útero por la vía hematógica o vaginal. Estos agentes infecciosos pueden causar ME alterando el ambiente uterino (endometritis), por medio de efectos sistémicos como viremias, septicemias y toxemias o a través de un efecto citolítico directo sobre los embriones. También se ha propuesto de forma simple que los patógenos sistémicos al causar fiebre en etapas tempranas de la gestación pueden conducir a la ME como resultado de la desnaturalización en las proteínas embrionarias; este mismo estado febril conlleva al estímulo en la liberación de prostaglandinas causando luteólisis y la subsecuente pérdida de la gestación (Christianson, 1992).

De esta forma, los virus son el grupo que más afecta el desarrollo embrionario temprano. En este grupo se hallan principalmente dos tipos: el virus del herpes bovino tipo 1 (BHV-1) y el virus de la diarrea viral bovina (BVDV). Bielanski *et al.* (1993) aislaron ambos tipos del líquido folicular, células de la granulosa y zona pelúcida, asimismo, estudiaron sus efectos *in vitro* durante la

fase pre y pos-eclosión de los embriones de la zona pelúcida. Por el contrario, Vanroose *et al.* (1999) aseguran que una vez llevado a cabo el proceso de la fertilización, la barrera más efectiva en contra de los virus es la zona pelúcida, a menos que esta última se altere debido a un ambiente uterino desfavorable.

La forma de replicación viral en el ambiente uterino es similar en las células embrionarias una vez que han eclosionado de la zona pelúcida, provocando como resultado muerte o daño en las funciones celulares. Básicamente la replicación viral dentro de las células produce daño cromosómico, el cual induce a las células embrionarias a una división retardada; este retraso en la división celular ocurre principalmente durante el periodo crítico de la organogénesis, afectando el desarrollo normal del embrión (Vanroose *et al.*, 2000).

Por otra parte, agentes bacterianos como *Vibrio fetus veneralis* (antes *Campylobacter fetus*) y por el lado de los protozoarios *Tritrichomonas foetus*, se han identificado como una de las causas de muerte embrionaria temprana, sin embargo, en la actualidad con la aplicación de bacterinas y el uso de la IA, el riesgo de contagio ha disminuido (Zavy, 1994). Asimismo, enfermedades como Brucelosis, Leptospirosis y Neosporosis aunque se encuentran ampliamente distribuidas mundialmente y su importancia no solamente radica en las pérdidas económicas de la producción animal sino también como un riesgo en la salud humana, sus principales daños se han reportado básicamente como causas de muerte fetal y abortos (Moen *et al.*, 1998; Richtzenhain *et al.*, 2002).

Estrés calórico

Las altas temperaturas ambientales durante los primeros meses de gestación también pueden tener efectos detrimentales sobre el embrión (DelaSota, 1998). Este efecto ha sido demostrado por Cavestany *et al.* (1985) quienes observaron en vacas lecheras que los porcentajes de gestación en la época de calor tuvieron un rango inferior (20-30%) con respecto a la época de invierno.

Posteriormente, Sartori *et al.* (2002) con el fin de evaluar el efecto del estrés calórico sobre la calidad de los embriones recolectados y los índices de fertilización realizaron dos experimentos, ambos en distintas épocas del año. En la primera fase (verano) compararon la respuesta entre dos grupos de animales; vacas lactando y vaquillas, observando índices de fertilización de 55% *versus* 100%, respectivamente. En la segunda fase (invierno) compararon las respuesta entre vacas lactando y vacas secas, observando índices de fertilización de 87.8% *versus* 89.5%, respectivamente. De esta forma, aunque en el grupo de novillas se observó un elevado índice de fertilización y asimismo en la calidad embriones recolectados, la respuesta en el grupo de vacas lactando en la época de verano fue significativamente inferior comparada con ambos grupos en la fase de invierno. Así, argumentaron que la reducción en el porcentaje de fertilidad se debió a la deficiencia del ovocito en el bloqueo de la poliespermia, causada por el estrés calórico que experimentaron las vacas lactando durante la época de verano. Otro mecanismo propuesto por el cual el estrés calórico tiene un efecto indirecto sobre los embriones se debe al incremento en la temperatura uterina; donde la irrigación sanguínea se aleja del útero hacia la circulación periférica en un intento por mantener la temperatura corporal, lo que produce una reducción en el aporte de nutrientes hacia el embrión y por consiguiente compromete su viabilidad (Dziuk, 1992).

El efecto del estrés calórico sobre los embriones también ha sido estudiado *in vitro*. Así, Hernández-Cerón *et al.* (2004) expusieron embriones de la raza Angus (*B. taurus*), Brahman y Romosinuano (*B. indicus*) a cambios bruscos de temperatura, donde inicialmente los embriones fueron cultivados a 38.5°C, posteriormente el grupo experimental se expuso a un choque térmico de 41°C durante cuatro horas. De esta forma, observaron que no existía un efecto significativo entre las razas antes mencionadas y el desarrollo embrionario cuando la temperatura se mantuvo a 38.5°C. Sin embargo, exponiendo a los embriones a un choque térmico de 41°C observaron que el desarrollo embrionario de la raza Angus disminuyó en comparación con los embriones *B. indicus*, atribuyendo que el

proceso de adaptación al medio ambiente caluroso de las razas Brahman y Romosinuano se debe en ambos casos a la selección de genes que controlan la termotolerancia a nivel celular.

2.2.2. Muerte embrionaria tardía

Considerando la clasificación de muerte embrionaria realizada por Humblot (2001), y mediante la aplicación de la ultrasonografía de tiempo real en la investigación veterinaria es posible caracterizar el patrón y los porcentajes de muerte embrionaria tardía en el ganado bovino. Bajo condiciones de campo el diagnóstico de gestación ha sido realizado de forma rápida y precisa en el día 26 post-IA, donde su importancia fundamental se basa en comprobar la viabilidad de los embriones mediante la detección del latido cardiaco (Curran *et al.*, 1986^b; Kastelic *et al.*, 1991). Una vez realizado el diagnóstico precoz de gestación y asimismo confirmando la viabilidad de los embriones, el estudio de la muerte embrionaria tardía ha sido caracterizado mediante ultrasonografía en diversos estudios. Por ejemplo, a partir de las primeras investigaciones realizadas en novillas por Pierson y Ginther (1984) para estudiar el desarrollo embrionario, se observó la muerte embrionaria en dos ocasiones, ambas en el día 36 post-IA y posteriormente en el día 37 reportaron la posible expulsión del producto al no ser observado durante los subsiguientes monitoreos. Mas tarde, Chaffaux *et al.* (1986) al realizar el diagnóstico precoz de gestación y monitoreo de la muerte embrionaria en un grupo de vacas lecheras, reportaron un 23% de ME en embriones que previamente habían sido confirmados como viables con base en la observación del latido cardiaco, estas pérdidas ocurrieron entre los días 35 y 44 post-IA, sin embargo no se reportó cual fue el destino de tales embriones. Para determinar cual es el destino final del cuerpo lúteo y de los embriones una vez que estos últimos experimentan muerte embrionaria, Kastelic y Ginther (1989) aplicaron PGF_{2α} a dos grupos de novillas, un grupo en el día 24 y otro en el día 42 post-IA, y mediante el monitoreo ultrasonográfico caracterizaron los resultados.

Los investigadores observaron que la muerte embrionaria ocurrió dos días después de la administración de la PGF_{2α}, asimismo, los embriones sufrieron mínima degeneración tisular, sin embargo, la expulsión del producto por la vía vaginal ocurrió en promedio 4 y 7 días después del tratamiento en el grupos tratados al día 24 y 42 post-IA, respectivamente. De la misma forma, la regresión del CL se llevó a cabo dentro de los tres días subsiguientes a la administración de la PGF_{2α} y el tiempo en el que ocurrió la muerte embrionaria. Posteriormente, Kastelic *et al.* (1991) confirmarían estos hallazgos agregando a la investigación el análisis de los niveles plasmáticos de P₄ para confirmar el diagnóstico de gestación y la posterior muerte embrionaria.

Factores genéticos

Otro desorden genético que también está implicado con la muerte embrionaria es la deficiencia de uridin-5-monofosfato sintetasa (UMP), esta enzima es responsable de la síntesis *de novo* de los nucleótidos de pirimidina necesarios para la construcción de moléculas de ADN y ARN (Shanks y Robinson, 1989). Posteriormente, en el día 35 de gestación, Shanks *et al.* (1992) evaluaron embriones homocigóticos recesivos para este desorden y observaron que estos últimos producían cantidades inferiores de UMP comparados con embriones heterocigóticos, por último demostraron que los embriones homocigóticos pueden desarrollarse en etapas tempranas, pero mueren aproximadamente antes del día 40 de gestación.

Alteraciones endocrinas

Un hallazgo interesante ha sido el reportado por Shore *et al.* (1998), los cuales diseñaron un experimento para evaluar si las concentraciones periféricas de estrógenos (E₂) al momento de la IA tenían algún efecto sobre la viabilidad de los embriones. De esta forma, estimulando los niveles plasmáticos de E₂ por

medio de la dieta en un grupo de vacas observaron en estas últimas que las concentraciones periféricas de esta hormona fueron significativamente mayores comparadas con los grupos testigo, posteriormente, al confirmar el diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía en el día 21 post-IA encontraron que las vacas con niveles elevados de E₂ tuvieron un rango de 24 a 29% de muerte embrionaria *versus* los grupos testigo donde observaron un 14%. Así, concluyeron que las concentraciones elevadas de E₂ al momento de la IA tuvieron una relación directa con la mortalidad embrionaria observada, sin embargo, el mecanismo por el cual los E₂ ejercen este efecto no fue descrito.

CAPITULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación consistió en el monitoreo de los embriones mediante ultrasonografía a partir del día 20 hasta el día 40 post-IA en ganado bovino del trópico húmedo. El propósito de cada monitoreo fue medir de forma longitudinal y transversal el desarrollo del embrión y determinar las características que pueden ser observadas mediante ultrasonografía para determinar el tiempo de gestación. El estudio se realizó en dos partes.

Localización

La primera parte se llevó a cabo durante la época de otoño en la finca "La Balsa", perteneciente al Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), ubicada en San Ramón, provincia de Alajuela (10°25'N, latitud 84°, longitud 32 O). Esta área está situada a una altura de 75 metros sobre el nivel del mar, el clima de la región es del tipo tropical húmedo con una precipitación media anual de 3096 mm, temperatura promedio de 27.3°C y humedad relativa de 85.3% (Molina *et al.*, 2002).

La segunda parte se realizó durante la temporada de verano en el rancho "La Soledad" perteneciente al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM), ubicada en el estado de Veracruz (20°N y 97°O. El clima es de tipo cálido húmedo, precipitación media anual de 1840 mm y temperatura promedio de 23.4°C (Corro *et al.*, 1999).

Animales

Se utilizó un grupo de 137 hembras mayormente del tipo *B. indicus* con un rango de edad entre 3 y 8 años y un promedio de peso de 346.63 ± 60.9 kg. En la primera parte se sincronizaron 95 hembras y en la segunda 42.

Metodología

Los animales fueron sincronizados mediante un implante auricular subcutáneo de progesterona sintética (Norgestomet) aplicado durante 9 días, una vez retirado el implante se administró una inyección por vía intramuscular de Valerato de Estradiol (Crestar; Laboratorios Intervet, México). Posteriormente todas las hembras fueron inseminadas artificialmente a tiempo fijo 48 y 72 horas después de retirado el implante.

El diagnóstico de gestación fue realizado por vía transrectal cada segundo día a partir del día 20 hasta el día 40 post-IA, utilizando para este propósito un equipo Aloka SSD-500 Microplus con un transductor lineal de 7.5 MHz. La exploración del útero por medio de la ultrasonografía se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Pierson *et al.* (1988). Asimismo, el examen de cada hembra se registró en formato VHS para observar y analizar con detalle las estructuras embrionarias y caracterizar la muerte embrionaria.

En el presente estudio, se definió como precisión a la capacidad de detectar que porcentaje de las vesículas embrionarias y embriones pueden ser observados mediante el equipo ultrasonográfico en el total de los animales.

Durante el monitoreo ultrasonográfico las variables registradas fueron la medición (cm) del eje longitudinal y transversal del embrión, la longitud de la vesícula embrionaria y el latido cardiaco (presencia o ausencia). Para comparar las posibles diferencias entre los valores de las mediciones del embrión y los diferentes días del monitoreo se realizó un análisis de varianza. Por otra parte, se realizó la técnica de análisis de regresión lineal simple con el objetivo de

corroborar la relación existente entre la vesícula embrionaria, el desarrollo longitudinal, transversal y la edad del embrión (Curran *et al.*, 1986^b). En promedio se realizaron 24 monitoreos ultrasonográficos, teniendo como mínimo y máximo entre 12 y 39 observaciones cada segundo día, respectivamente. Todos los exámenes fueron realizados por el mismo operador. Los criterios de exclusión fueron para todas las hembras que repitieron celo post-IA, se encontrasen vacías sin cuerpo lúteo y también para aquellos animales en los cuales después de tres monitoreos no fue posible detectar la vesícula embrionaria.

CAPITULO 4

RESULTADOS

Del grupo inicial ($n = 137$) únicamente se utilizaron 50 hembras, en las cuales se realizó un total de 267 observaciones, teniendo un promedio de 24 monitoreos ultrasonográficos realizados cada dos días. El resto del grupo se excluyó de acuerdo a los criterios planteados en el capítulo de materiales y métodos. En el día 20 del primer monitoreo, 60% (12/20) de las hembras examinadas presentaron una estructura no ecogénica con una longitud promedio de 0.44 ± 0.20 cm (Cuadro 1 y 2). Sólo 66.6% (8/12) de las primeras vesículas observadas exhibieron una estructura ecogénica presumiblemente embrionaria con longitud promedio de 0.20 ± 0.07 cm y midiendo de forma transversal 0.07 ± 0.02 cm, que mediante el posterior seguimiento se precisó como un embrión. En el día 24 se detectó el latido cardíaco en 50% (9/18) de los embriones observados, posteriormente en el día 26 la precisión fue del 100% en todos los embriones y así continuó hasta el final de la investigación. En este día (26), la vesícula embrionaria midió en promedio 0.95 ± 0.30 cm, el embrión midió en promedio de forma longitudinal y transversal 0.44 ± 0.12 cm y 0.14 ± 0.06 cm, respectivamente. Al final del monitoreo (día 40), el diámetro promedio de la vesícula alcanzó 2.49 ± 0.36 cm (Fig. 1), el embrión midió en promedio longitudinalmente 1.92 ± 0.24 cm (Fig. 2) y de forma transversal 0.85 ± 0.11 cm (Fig. 3).

Con respecto a la detección de la muerte embrionaria, entre los días 30-36 del monitoreo se observó la muerte de tres embriones con dos días de diferencia entre cada uno, siendo la ausencia del latido cardíaco la característica que determinó dicho evento, asimismo, se observó degeneración progresiva del tejido embrionario. De la misma forma, al realizar el diagnóstico de la muerte embrionaria, las dimensiones de la vesícula embrionaria disminuyeron considerablemente hasta el final del monitoreo. Durante los subsiguientes

monitoreos se caracterizó la curva de muerte embrionaria en los respectivos embriones comparada con el desarrollo promedio de los embriones viables (Fig. 4, 5 y 6).

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

En el presente estudio, el tamaño promedio de las vesículas embrionarias a partir del día 20 fue de 0.44 ± 0.20 cm, siendo similares a los hallazgos de Curran *et al.* (1986^b), donde las dimensiones de las vesículas fueron de 0.54 ± 0.06 cm. En contraste, los datos de Curran *et al.* (1986^b) difieren en el tamaño longitudinal del embrión al día 20, ya que reportan una longitud promedio de 0.38 ± 0.03 cm en comparación con la presente investigación, donde la longitud promedio del embrión fue de 0.20 ± 0.07 cm. Asimismo, Totey *et al.* (1991) reportaron un índice de crecimiento significativamente superior, donde el embrión tuvo una longitud promedio de 0.45 ± 0.08 cm. Así, de acuerdo a nuestras observaciones un embrión de 20 días de gestación no puede ubicarse dentro de la escala de crecimiento de Curran *et al.* (1986^b) y Totey *et al.* (1991) debido a las obvias diferencias en la longitud de los embriones. Probablemente, el tipo de transductor utilizado en nuestra investigación proporcionó la diferencia en las dimensiones embrionarias, ya que en los estudios antes mencionadas su utilizaron transductores de 3.5 y 5.0 MHz en comparación con el transductor utilizado en la presente investigación, donde la capacidad del transductor fue de 7.5 MHz, el cual proporciona mayor definición y detalle en las imágenes emitidas. De la misma forma, el aparente lento desarrollo embrionario puede estar relacionado con los hallazgos observados por Hernández-Cerón *et al.* (2004), quienes publicaron que los embriones sometidos al estrés calórico presentaban retraso en su desarrollo comparados con los embriones cultivados en temperaturas óptimas.

De forma cronológica, otro hallazgo interesante fue la precisión para detectar el latido cardiaco, que es el indicador específico en la viabilidad de los embriones (Kastelic y Ginther, 1989). Según Pierson y Ginther (1984) el latido cardiaco fue observado entre los días 26-29 de gestación y la longitud promedio del embrión fue de 0.10 cm en el día 26 post-IA. No obstante, existe controversia

en la literatura sobre este tema, pues mientras un grupo informa una precisión del 100% al día 22 de gestación (Kastelic *et al.* 1989), Totey *et al.* (1991) detectaron escasamente un 26% en el mismo día. En el presente estudio, el latido cardiaco fue observado en 50% (9/18) de los embriones a partir del día 24 de gestación, y en el día 26 la precisión se incrementó al 100%. En contraste, bajo nuestras condiciones experimentales detectar el latido cardiaco con precisión al día 22 post-IA desafortunadamente fue muy difícil *versus* lo reportado por Curran *et al.* (1986^a) y Kastelic *et al.* (1989), debido probablemente al mayor tamaño de las estructuras anatómicas que estos últimos investigadores registraron. Posteriormente, entre el día 30 y 40 de gestación la curva de desarrollo embrionario se comportó de forma similar a lo reportado por Pierson y Ginther (1984), Curran *et al.* (1986^b) y Totey *et al.* (1991) donde el tamaño longitudinal de los embriones en el día 40 fue de aproximadamente 2.00 cm, cifras semejantes a la longitud promedio del presente estudio (1.92 ± 0.24 cm).

Por lo tanto, se puede concluir en cuanto a las dimensiones de los embriones del ganado *B. indicus* mantenido bajo las condiciones del trópico que la velocidad de crecimiento difiere al menos entre los días 20 y 30 de gestación comparado con el ganado *B. taurus*, el cual presenta un índice de crecimiento mayor.

La gran mayoría de las investigaciones realizadas para caracterizar el desarrollo y la muerte embrionaria giran alrededor de algunas publicaciones en las cuales utilizaron básicamente ganado de la raza Holstein mantenido bajo condiciones de clima templado. Por otra parte, diversos estudios como ya fue indicado, han demostrado que los embriones sometidos al estrés calórico en condiciones *in vivo* (Putney *et al.*, 1988) e *in vitro* (Paula-Lopes *et al.*, 2003; Hernández-Cerón *et al.*, 2004) presentan anomalías y retraso en su desarrollo debido al choque térmico que experimentan a nivel celular. En nuestra investigación, el desarrollo de los embriones fue evidentemente lento comparado con los estudios realizados en ganado de la raza Holstein; particularmente durante el periodo comprendido entre los días 20-30 de gestación. Este retraso en el

desarrollo fue compensado a partir de este último periodo hasta el día 40 de gestación, donde el índice del desarrollo embrionario fue similar. Queda por ser demostrado si este lento desarrollo es un reflejo del retraso en el crecimiento observado a partir del día 4 post-IA, en embriones que fueron sometidos a estrés calórico (Hernández-Cerón *et al.*, 2004), o es una situación normal para este tipo de ganado. Sea cual fuese el caso, el desarrollo de los embriones de tipo Cebú comparado con los embriones Holstein merece mayor investigación. Asimismo, es necesario conocer si la escala de crecimiento observada en el presente estudio puede ser validada en otras investigaciones con diferentes operadores y animales criados bajo las condiciones del trópico húmedo. Por ejemplo, O'Rourke *et al.* (1991) al comparar la velocidad de crecimiento fetal del ganado *B. indicus* versus el ganado *B. taurus* en vacas mantenidas bajo condiciones extensivas de pastoreo en el trópico, demostraron que no existía ningún efecto significativo entre la edad y raza de la vaca así como también en el sexo fetal de ambas razas al estimar su crecimiento anatómico. Sin embargo, reportaron que la velocidad del crecimiento fetal en el ganado *B. taurus* fue superior al menos durante el primer trimestre de gestación comparado con los fetos del genotipo *B. indicus*. Es así, como las investigaciones realizadas a nivel embrionario y fetal y con base en nuestros hallazgos obtenidos nos hace suponer que existe diferencia en la velocidad de crecimiento del ganado *B. indicus* debido principalmente a dos factores. El primero de ellos se debe a las condiciones ambientales donde se encuentra distribuido este tipo de ganado, donde ya ha sido demostrado ampliamente tanto *in vivo* como *in vitro* que el estrés calórico retrasa el desarrollo y la calidad de los embriones (Ryan *et al.*, 1993; Hernández-Cerón *et al.*, 2004). En segundo lugar, se ha documentado ampliamente que el ganado *B. taurus* presenta un índice de crecimiento fisiológico notablemente superior *versus* el ganado *B. indicus*, esto debido simplemente a las características genéticas de cada especie (Chenoweth, 1994; McDowell *et al.*, 1996).

En cuanto a las dimensiones de la vesícula embrionaria, estas fueron irregulares durante todo el monitoreo, probablemente por no ser una estructura totalmente sólida se encuentra sujeta a los cambios de forma debido a la manipulación de los cuernos uterinos. De tal forma, al realizar el estudio del desarrollo embrionario Badtram *et al.* (1991) aseguran que al controlar factores como son el tipo de transductor utilizado, experiencia del técnico, tiempo de gestación y edad de los animales examinados, las discrepancias entre los resultados obtenidos deberían de ser mínimas. Con base en ello, recomendamos realizar un mayor número de investigaciones en ganado *B. indicus* para estandarizar la curva de desarrollo embrionario y de esta forma disminuir el posible efecto derivado de la edad de la vaca, tipo de transductor utilizado e inclusive el operador que realice el monitoreo ultrasonográfico.

Con respecto a la muerte embrionaria, durante nuestra investigación ocurrieron tres casos entre los días 30-36 del monitoreo con dos días de diferencia entre cada uno. Considerando que durante el monitoreo se confirmó un total de 50 (100%) embriones viables y solo 3 pérdidas embrionarias de ese total; es obvio estimar que el porcentaje de muerte embrionaria fue del 6%. De forma similar, la mortalidad embrionaria ha sido observada por Pierson y Ginther (1984), Chaffaux *et al.* (1986), Kastelic *et al.* (1991) y Gregory *et al.* (1996) dentro de este mismo periodo, sin embargo, los investigadores publicaron índices que variaron de 13.3% a 24% de muerte embrionaria, siendo este último porcentaje cuatro veces mayor que los hallazgos realizados en la presente investigación. Probablemente, los índices de muerte embrionaria pueden variar de acuerdo a la época del año en que es realizado el estudio, por ejemplo, Gregory *et al.* (1996) observaron un mayor porcentaje de muerte embrionaria cuando el monitoreo fue realizado en la época de primavera-verano, comparado con los hallazgos observados en la época de otoño-invierno, donde los porcentajes de muerte embrionaria fueron de 18% y 9.4%, respectivamente. En el presente estudio, el índice de 6% en la muerte embrionaria se observó cuando el estudio se realizó a principios de verano, siendo

este porcentaje tres veces menor a lo observado por Gregory *et al.* (1996) durante la época de primavera-verano. Al respecto, las investigaciones realizadas bajo las condiciones del trópico húmedo con ganado Cebú señalan que los mayores índices de fertilidad se obtienen cuando la temporada de empadre se realiza durante la época de primavera-verano, ya que la disponibilidad de forrajes naturales favorecen el estado nutricional de los animales y por consiguiente su capacidad reproductiva (Chenoweth, 1994).

Las pérdidas embrionarias se caracterizaron por la degeneración gradual del tejido, acompañado de la rápida disminución en el tamaño de la vesícula embrionaria, asimismo, se observó la regresión del tejido lúteo a partir de la muerte embrionaria. Investigaciones realizadas para caracterizar el destino final del embrión y cuerpo lúteo una vez que estos experimentan muerte embrionaria, señalan características muy similares a lo reportado en el presente estudio. Sin embargo, la expulsión o el aborto del producto reportado por Kastelic *et al.* (1989) y Kastelic *et al.* (1991) dentro de los cuatro y siete días después de haber sido diagnosticada la muerte embrionaria, difiere en cuanto a nuestra investigación, ya que al detectar nuestra primera pérdida embrionaria (día 32) continuamos localizando al embrión dentro del útero hasta el final del monitoreo. Por tal motivo, sería muy aventurado estipular que la expulsión ocurrió en los subsiguientes días ya que no contamos con un registro posterior debido a que una vez finalizado el estudio en el día 40 de gestación nos retiramos de las instalaciones.

Es preciso recordar que el diagnóstico precoz de gestación a través de la ultrasonografía *per se* no incrementa los índices de muerte embrionaria, por el contrario, ha demostrado ser una herramienta práctica de manejo que ayuda a identificar de forma rápida y precisa animales no gestantes, así como también la proporción de pérdidas embrionarias (Boyd *et al.*, 1988; Ball y Logue, 1994; Baxter y Ward, 1997).

En conclusión, la ultrasonografía continúa siendo una valiosa herramienta para el diagnóstico precoz de gestación y el estudio del desarrollo embrionario. En nuestra investigación la detección de un embrión propiamente dicho sólo es posible con 100% de confianza a partir del día 24 post-IA. Asimismo, en el día 26 de gestación el diagnóstico tiene un valor agregado, ya que es posible observar la presencia del latido cardiaco, siendo esta la característica que determina finalmente la viabilidad de los embriones. Por lo que utilizar el equipo ultrasonográfico antes de este periodo no parece ser un método recomendable para confirmar animales gestantes, pues como ya quedo indicado la eficiencia en el presente estudio fue de 66.6% en el día 20 y del 100% en el día 24 post-IA. Otro hallazgo interesante observado en la presente investigación fue la diferencia que existió entre el desarrollo embrionario del ganado Cebú y índice de crecimiento reportado en ganado Holstein. Por tal motivo, opinamos que al utilizar la curva de crecimiento del ganado Holstein para extrapolarla al estudio del ganado Cebú pudiera provocar errores en su aplicación.

La escala de desarrollo embrionario entre los días 20 y 40 de gestación en ganado Cebú criado bajo las condiciones del trópico podrá facilitar el estudio de la muerte embrionaria, asimismo, podría ayudar a evaluar el comportamiento reproductivo de sementales utilizados en programas cortos de monta natural o en sistemas combinados; ya sea de IA y posteriormente monta natural, e incluso en programas rotativos con sementales. Por tal motivo, en el ganado Cebú criado bajo las condiciones del trópico húmedo es necesario seguir caracterizando la curva de desarrollo embrionario con el fin de establecer un patrón de crecimiento exacto que sea de utilidad en los programas reproductivos.

CAPITULO 6

REFERENCIAS

Alexander BM, Johnson MS, Guardia RO, Van de Graaf WL, Senger PL, Sasser RG. Embryonic loss from 30 to 60 days post breeding and the effect of palpation per rectum on pregnancy. *Theriogenology* 1995;43: 551-556.

Amiridis GS, Belibasaki S, Leontides L, Lymberopoulos A, Vainas E. Reproductive efficiency of three estrus synchronization schemes comprising fixed-time insemination in dairy cows. *J Vet Med* 2000;A47:271-276.

Archibong AE, Diehl JR. Evaluation of an ultrasonic amplitude depth analysis technique for pregnancy diagnosis in the cow. *Am J Vet Res* 1982;43:711-713.

Badtram GA, Gaines JD, Thomas CB, Bosu WTK. Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound scanning of the uterus. *Theriogenology* 1991;35:1153-1167.

Ball PJH, Logue DDN. Ultrasound diagnosis of pregnancy in cattle. *Vet Rec* 1994;134:532.

Baxter SJ, Ward WR. Incidence of fetal loose in dairy cattle after pregnancy diagnosis using an ultrasound scanner. *Vet Rec* 1997;140:287-288.

Beam SW, Butler WR. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J Reprod Fertil Suppl* 1999;54:411-24.

Bielanski A, Loewen KK, DelCampo M, Sirard M, Willadsen S. Isolation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in association with the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 1993;40:531-545.

Booth JM, Davies J, Holdsworth RJ. Use of the milk progesterone test for pregnancy determination. *Brit Vet J* 1979;135: 478-488.

Boyd JS, Omran SN, Ayliffe TR. Use of a high frequency transducer with real time B-mode ultrasound scanner to identify early pregnancy in cattle. *Vet Rec* 1988;123:8-11.

Breuel KF, Lewis PE, Schrick FN, Lishman AW, Inskeep EK, Butcher RL. Factors affecting fertility in the postpartum cow: Role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biol Reprod* 1993;48:655–661.

Bulman DC, Lamming GE. Cases of prolonged luteal activity in the non-pregnant dairy cow. *Vet Rec* 1977;100;550-552.

Bulman DC. The measurement of progesterone in milk. *Br Vet J* 1979;135:460-461.

Bulman DC, Lamming GE. The use of milk progesterone analysis in the study of oestrus detection, herd fertility and embryonic mortality in dairy cows. *Br Vet J* 1979;135:559-567.

Butler WR, Smith RD. Interrelationships between energy balance on postpartum reproductive function in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1989;72:767-783.

Butler WR, Calaman JJ, Beam SW. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J Anim Sci* 1996;74:858-865.

Butler WR. Symposium: Optimizing protein nutrition for reproduction and lactation. Review. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1998;81:2533-2539.

Cavestany D, El-Whishy AB, Foot RH. Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein cattle. *J Dairy Sci* 1985;68:1471-1478.

Chaffaux S, Reddy GNS, Valon F, Thibier M. Transrectal real-time ultrasound scanning for diagnosis pregnancy and for monitoring embryonic mortality in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 1986;10:193-200.

Chagas e Silva J, Lopes da Costa L, Robalo Silva J. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology* 2002;58:51-59.

Chebel RC, Santos JEP, Reynolds JP, Cerri RLA, Juchem SO, Overton M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004;84:239-255.

Chenoweth PJ. Aspects of reproduction in female *Bos indicus* cattle: A review. *Aust Vet J* 1994;71:422-426.

Christianson WT. Stillbirths, mummies, abortions and early embryonic death. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1992;8:623-639.

Committee on Reproductive Nomenclature. Recommendations for standardising bovine reproductive terms. *Cornell Veterinarian* 1972;62:216-237.

Cordoba MC, Sartori R, Fricke PM. Assessment of a commercially available early conception factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle. *J Dairy Sci* 2001;84:1884-1889.

Corro M, Rubio I, Castillo E, Galindo L, Aluja A, Galina CS, Murcia C. Effects of blood metabolites, body condition and pasture management on milk yield and postpartum intervals in dual-purpose cattle farms in the tropics of the State of Veracruz, México. *Prev Vet Med* 1999;38:101-117.

Curran S, Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from day 10 through 20. *J Am Vet Med Assoc* 1986^a;189:1289-1294.

Curran S, Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from day 20 through 60. *J Am Vet Med Assoc* 1986^b;189:1295-1302.

DelaSota RL, Burke JM, Risco CA, Moreira F, DeLorenzo MA, Thatcher WW. Evaluation of timed insemination during summer heat stress in lactating dairy cattle. *Theriogenology* 1998;49:761-770.

Diskin MG, Sreenan JM. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J Reprod Fertil* 1980;59:463-468.

Dunne LD, Diskin MG, Sreenan JM. Embryo and fetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim Reprod Sci* 2000;58:39-44.

Dziuk PJ. Embryonic development and fetal growth. *Anim Reprod Sci* 1992;28:299-308.

Eastman SA. Methods of improving the accuracy of positive results from milk progesterone pregnancy tests. *Br Vet J* 1979;135:489-490.

Elrod CC, Butler WR. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J Anim Sci* 1993;71:694-701.

Farin CE, Imakawa K, Hansen TR, McDonnell JJ, Murphy CN, Farin PW, Roberts RM. Expressions of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biol Reprod* 1990;43:210-218.

Fissore RA, Edmonson AJ, Phashen RL, Bondurant RH. The use of the ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract. II. Non-pregnant, pregnant and pathological conditions of the uterus. *Anim Reprod Sci* 1986;12:167-177.

Franco OJ, Drost M, Thatcher MJ, Shille VM, Thatcher WW. Fetal survival in the cow after pregnancy diagnosis by palpation per rectum. *Theriogenology* 1987; 27: 631-644.

Fricke PM. Scanning the future-Ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002;85:1918-1926.

Galland JC, Offenbach LA, Spire MF. Measuring the time needed to confirm fetal age in beef heifers using ultrasonographic examination. *Vet Med* 1994;89:795-804.

Gandy B, Tucker W, Ryan P, Williams A, Tucker A, Moore A, Godfrey R, Willard S. Evaluation of the early conception factor (ECF™) test for the detection of nonpregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 2001;56:637-647.

Gaverick HA, Smith MF. Mechanism associated with subnormal luteal function. J Anim Sci 1986;62 Suppl 2:92-105.

Gregory RM, Mattos RC, Lamprecht M. Embryonic Mortality in Bovine—Ultrasonographic evaluation. Arq Fac Vet 1996;24:25-29.

Gutiérrez AC, Zarco L, Galina CS, Rubio I, Basurto H. Predictive value of palpation per rectum for detection of the CL in Zebu cattle as evaluated by progesterone concentrations and ultrasonography. Theriogenology 1996;46:471-479.

Hady PJ, Domecq JJ, Kaneene JB. Frequency and precision of body condition scoring in dairy cattle. J Dairy Sci 1994;77:1543-1547.

Hanzen C, Delsaux B. Use of transrectal B-mode ultrasound imaging in bovine pregnancy diagnosis. Vet Rec 1987;123:8-11.

Hanzen CH, Drion PV, Lourtie O, Depierreux C, Christians E. La mortalité embryonnaire. Aspect cliniques et facteurs étiologiques dans l'espèce bovine. Ann Med Vet 1999;143:91:118.

Hanzen CH, Pieterse M, Scenczi O, Drost M. Relative Accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation *per rectum*. Vet J 2000;159:161-170.

Hernández-Cerón J, Chase Jr. CC, Hansen PJ. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. J Dairy Sci 2004;87:53-58.

Hughes EA, Davies DAR. Practical uses of ultrasound in early pregnancy in cattle. Vet Rec 1989;124:456-458.

Humblot P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* 2001;56:1417–1433.

Iannuzzi L, Rangel-Figueiredo T, Di Meo GP, Ferrara L. A new Robertsonian translocation in cattle, rob(15;25). *Cytogenet Cell Genet* 1992;59:280-283.

Inskeep EK. Factors that affect fertility during oestrous cycles with short or normal luteal phases in postpartum cows. *J Reprod Fertil Suppl* 1995;49:493-503.

Kastelic JP, Curran S, Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology* 1988;29:39-54.

Kastelic JP, Ginther OJ. Fate of conceptus and corpus luteum after induced embryonic loss in heifers. *J Am Vet Med Assoc* 1989;194:922-928.

Kastelic JP, Curran S, Ginther OJ. Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology* 1989;31:813-820.

Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ. Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology* 1991;35:569-581.

Kelton DF, White ME, Hodges RJ, Guard CL, Powers PM, Dinsmore RP, Stehman SM, Hillman RB, Yoder SS. The relationships among palpator experience, milk progesterone concentration and estrus and fertility in cows with palpable corpora lutea treated with cloprostenol. *Cornell Vet* 1988;12:105-112.

King WA. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med* 1990;34:229-250.

Laing JA, Heap RB. The concentration of progesterone in the milk of cows during reproductive cycle. *Br Vet J* 1971;127:19-22.

Lemaster JW, Seals RC, Hopkins FM, Schrick FN. Effects of administration of oxytocin on embryonic survival in progestogen supplemented cattle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1999;57:259-268.

Lulai C, Kastelic JP, Carruthers TD, Mapletoft RJ. Role of luteal regression in embryo death in cattle. *Theriogenology* 1994;41:1081-1089.

Manns JG, Nkuuhe JR, Bristol F. Prostaglandin concentrations in uterine fluid of cows with pyometra. *Can J Comp Med* 1985;49:436-438.

McDowell RE, Wilk JC, Talbott CW. Economic viability of crosses of *Bos taurus* and *Bos indicus* for dairying in warm climates. *J Dairy Sci* 1996;79:1292-1303.

Moen AR, Wouda W, Mul MF, Graat EAM, van Werven T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: A retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology* 1998;49:1301-1309.

Molina R, Galina CS, Camacho J, Maquivar M, Diaz GS, Estrada S, Martínez L. Effects of alternating bulls as a management tool to improve the reproductive performance of suckled Zebu cows in the humid tropics of Costa Rica. *Anim Reprod Sci* 2002;69:159-173.

Nation DP, Malmo J, Davis GM, Mcmillan KL. Accuracy of bovine pregnancy detection using transrectal ultrasonography at 28 to 35 days after insemination. *Aust Vet J* 2003;81:63-65.

Nebel RL. On-farm progesterone tests. *J Dairy Sci* 1988;71:1682-1690.

O'Rourke PK, Entwistle KW, Arman C, Esdale CR, Burns BM. Fetal development and gestational changes in *B. taurus* and *B. indicus* genotypes in the tropics. *Theriogenology* 1991;36:839-853.

Oltenu PA, Ferguson JD, Lednor AJ. Economic evaluation of pregnancy diagnosis in dairy cattle: A decision analysis approach. *J Dairy Sci* 1990;73:2826-2831.

Palmer E, Driancourt MA. Use of ultrasound echography in equine gynecology. *Theriogenology* 1980;13:203-216.

Paula-Lopes FF, Chase Jr CC, Al-Katanani YM, Krininger III CE, Rivera RM, Tekin S, Majewski AC, Ocon OM, Olson TA, Hansen PJ. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: Differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction* 2003;125:285-294.

Pennington JA, Spahr SL, Lodge JR. Influences on progesterone concentration in bovine milk. *J Dairy Sci* 1981;64:256-266.

Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers. *Theriogenology* 1984;22:225-233.

Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology* 1988;29:21-37.

Pierson RA, Kastelic JP, Ginther OJ. Basic principles and techniques for transrectal ultrasonography in cattle and horses. *Theriogenology* 1988;29:3-19.

Pieterse MC, Szenci OA, Willemsee AH, Bajcosy CSA, Dieleman SJ, Taverne MAM. Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test. *Theriogenology* 1990;33:697-708.

Pulido A, Zarco L, Galina CS, Murcia C, Flores G, Posadas E. Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology* 1991;35:965-975.

Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* 1988;30:195-209.

Quintans G, Viñoles C, Sinclair KD. Follicular growth and ovulation in postpartum beef cows following calf removal and GnRH treatment. *Anim Reprod Sci* 2004;80:5-14.

Ribadu AY, Ward WR, Dobson H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. *Vet Rec* 1994;135:452-457.

Richtzenhain LJ, Cortez A, Heinemann MB, Soares RM, Sakamoto SM, Vasconcellos SA, Higa ZM, Scarcelli E, Genovez ME. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Vet Microbiol* 2002;87:139-47.

Rioux P, Rajotte D. Progesterone in milk: A simple experiment illustrating the estrous cycle and enzyme immunoassay. *Adv Physiol Educ* 2004;28:64-67.

Roberts SJ. Veterinary obstetrics and genital diseases. 3rd ed. Ithaca, New York: Edwards. Brothers, 1986: 51.

Robertson HA, Sarda LR. A very early pregnancy test for mammals: Its application to the cow, ewe and sow. *J Endocr* 1971;49:407-419.

Roche JF, Boland MP, McGeady TA. Reproductive wastage following artificial insemination in cattle. *Vet Rec* 1981;109:95-97.

Ryan DP, Prichard JF, Kopel E, Godke RA. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology* 1993;39:719-737.

Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002;85:2803–2812.

Shanks RD, Robinson JL. Embryonic mortality attributed to inherited deficiency of uridine monophosphate synthase. *J Dairy Sci* 1989;72:3035-3039.

Shanks RD, Popp RG, McCoy GC, Nelson DR, Robinson JL. Identification of the homozygous recessive genotype for the deficiency of uridine monophosphate synthase in 35-day bovine embryos. *J Dairy Sci* 1992;94:5-10.

Shore LS, Rios C, Marcus S, Bernstein M, Shemesh M. Relationship between peripheral estrogen concentrations at insemination and subsequent fetal loss in cattle. *Theriogenology* 1998;50:101-107.

Stevenson JS, Cartmill JA, Hensley BA, El-Zarkouny SZ. Conception rates of dairy cows following early not-pregnancy diagnosis by ultrasonography and subsequent treatments with shortened Ovsynch protocol. *Theriogenology* 2003;60:475-483.

Szenci O, Beckers JF, Humblot P, Sulon J, Sasser G, Taverne MAM, Varga J, Baltusen R, Gy Schekk. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology* 1998;50:77-88.

Thatcher WW, Guzeloglu A, Mattos R, Binelli, M, Hansen TR, Pru JK. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 2001;56:1435–1450.

Thirapatsukun T, Entwistle KW, Gartner RJW. Plasma progesterone levels as an early pregnancy test in beef cattle. *Theriogenology* 1978;9:323-332.

Thurmond MC, Picanso JP, Jameson CM. Considerations for use of descriptive epidemiology to investigate fetal loss in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 1990;197:1305-1312.

Totey SM, Singh, Taneja M, Talwar GP. Ultrasonography for detection of early pregnancy following embryo transfer in unknown breed of *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 1991;35:487:497.

Valon F, Erling W, Chaffaux S. Échographie en temps réel de la sphère urogénitale de la jument. Application au diagnostic précoce de la gestation. *Prat Vet Équi* 1981;13:97-106.

Vanroose G, Nauwynck H, Van Soom A, Ysebaert MT, Charlier G, Van Oostveldt P, de Kruif A. Why is the zona pellucida in vitro-produced bovine embryos an efficient barrier for viral infection? A scanning electron and confocal laser microscopic study. *Theriogenology* 1999;51:276.

Vanroose G, de Kruif A, Van Soom A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:131-143.

Waldmann A, Reksen O, Landsverk K, Kommisrud E, Dahl E, Refsdal AO, Ropstad E. Progesterone concentrations in milk fat at first insemination – effects on non-return and repeat-breeding. *Anim Reprod Sci* 2001;65:33-41.

Whates DC. Embryonic mortality and the uterine environment. *J Endocrinol* 1992;134:321-325.

White ME, LaFaunce N, Mohammed HO. Optimal time postbreeding for pregnancy examination in dairy cattle. *Can Vet J* 1989;30:147-149.

Wilson TD. Identification of the 1/29 Robertsonian translocation chromosome in British Friesian cattle. *Vet Rec* 1990;112:429-432.

Zavy MT. Embryonic mortality in cattle. In: Zavy MT and Geisert RD, editors. *Embryonic mortality in domestic species*. Boca Raton: CRC Press, 1994:99-140.

CAPITULO 7

CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Días del desarrollo embrionario en ganado bovino (*B. indicus*) del trópico húmedo donde se observa la precisión para detectar la vesícula embrionaria (Ve), el embrión (E) y el latido cardiaco (Lc).

Día pos-IA	No. de monitoreos	Ve	E	Lc
20	20	12/20 (60%)	8/12 (66.6%)	-
22	30	21/30 (70%)	18/21 (85.7%)	-
24	18	18/18 (100%)	18/18 (100%)	9/18 50%
26	28	28/28 (100%)	28/28 (100%)	28/28 100%

Cuadro 2. Escala de crecimiento embrionario entre el día 20 y 40 de gestación en ganado *B. indicus* criado bajo las condiciones del trópico húmedo. En promedio 24 observaciones para cada día.

Día pos-IA Embrión	20*	22*	24*	26*	28*	30*
Vesícula	0.44±0.21	0.61±0.19	0.95±0.31	1.12±0.34	1.62±0.64	1.80±0.84
Longitudinal	0.20±0.07	0.30±0.08	0.44±0.12	0.61±0.13	0.86±0.34	1.06±0.42
Transversal	0.07±0.03	0.09±0.03	0.15±0.06	0.22±0.08	0.37±0.18	0.50±0.24

Día pos-IA Embrión	32*	34*	36*	38*	40*
Vesícula	1.29±0.29	1.53±0.31	1.82±0.38	2.03±0.36	2.50±0.36
Longitudinal	1.03±0.30	1.24±0.25	1.50±0.22	1.68±0.22	1.92±0.24
Transversal	0.41±0.13	0.54±0.12	0.66±0.14	0.71±0.12	0.85±0.12

* Datos numéricos expresados en centímetros.

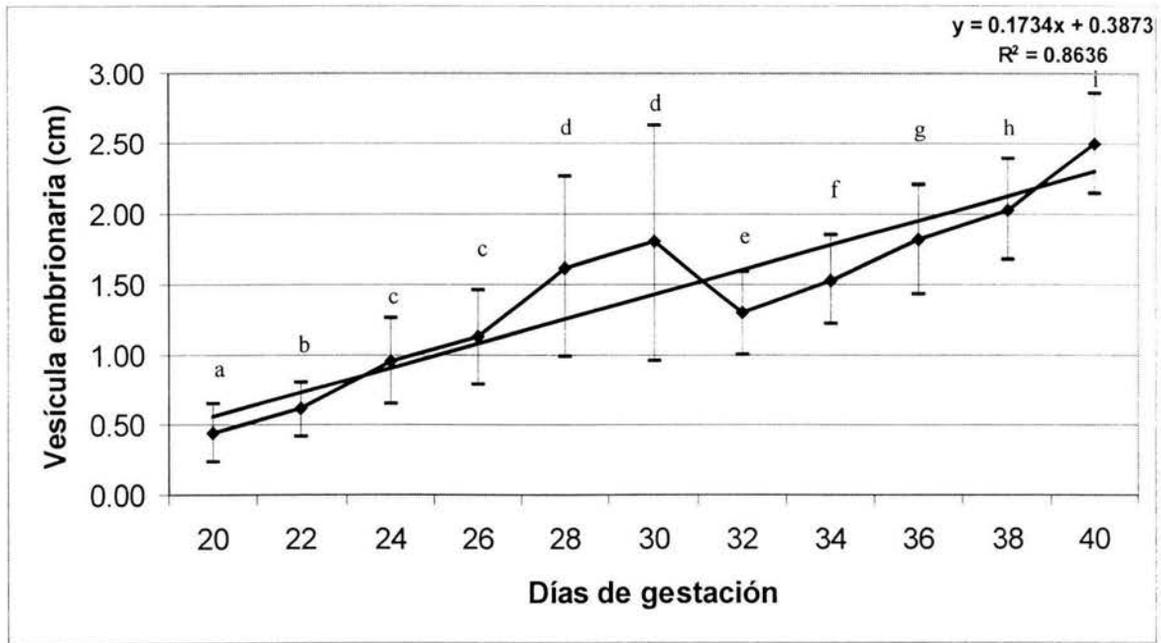


Figura 1. Relación existente entre el incremento en el tamaño de la vesícula embrionaria y los días del monitoreo ultrasonográfico en ganado bovino del trópico húmedo. Literales diferentes expresan diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

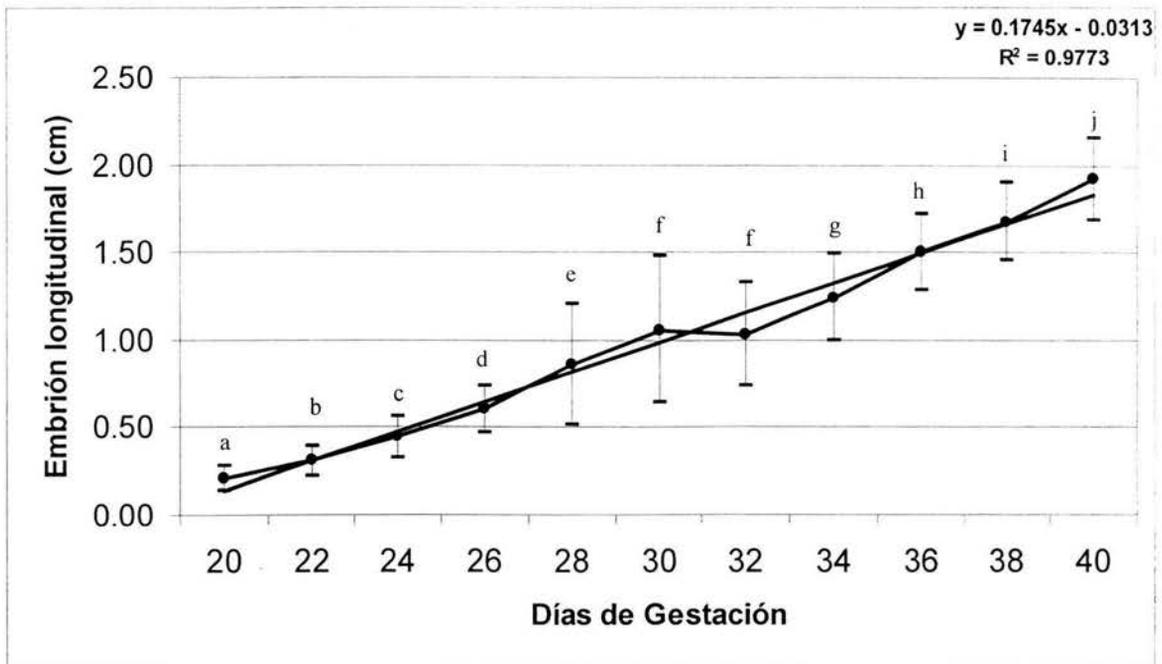


Figura 2. Desarrollo embrionario longitudinal entre el día 20 y 40 de gestación en ganado *B. indicus* del trópico húmedo. Literales diferentes expresan diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

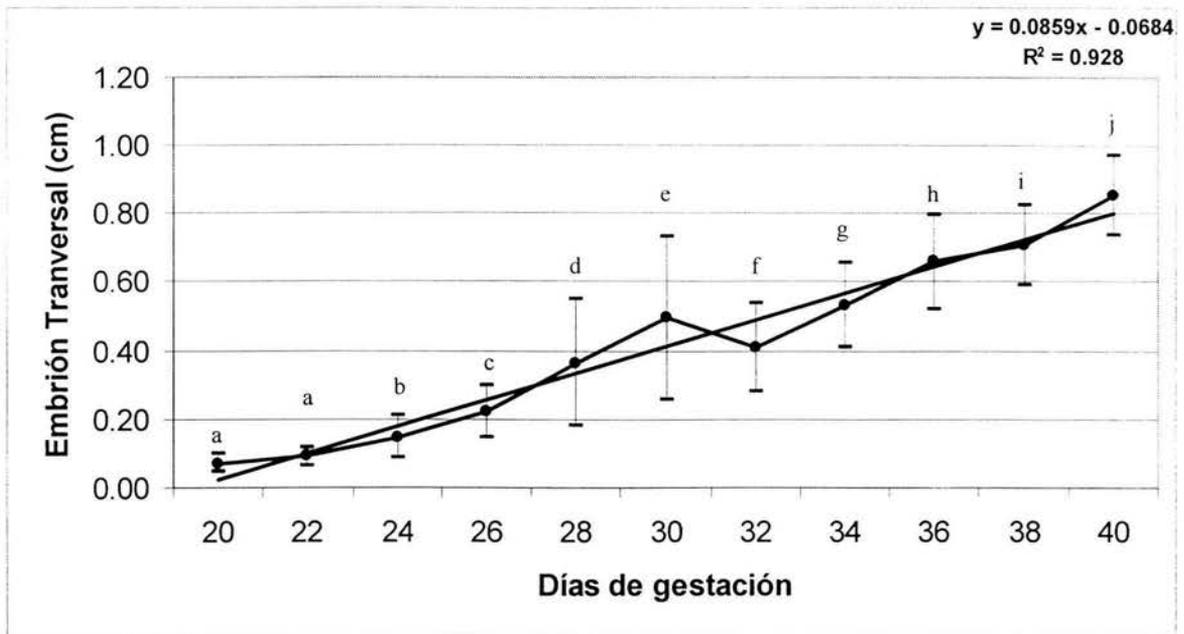


Figura 3. Desarrollo embrionario transversal en ganado *B. indicus* del trópico húmedo. Literales diferentes expresan diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

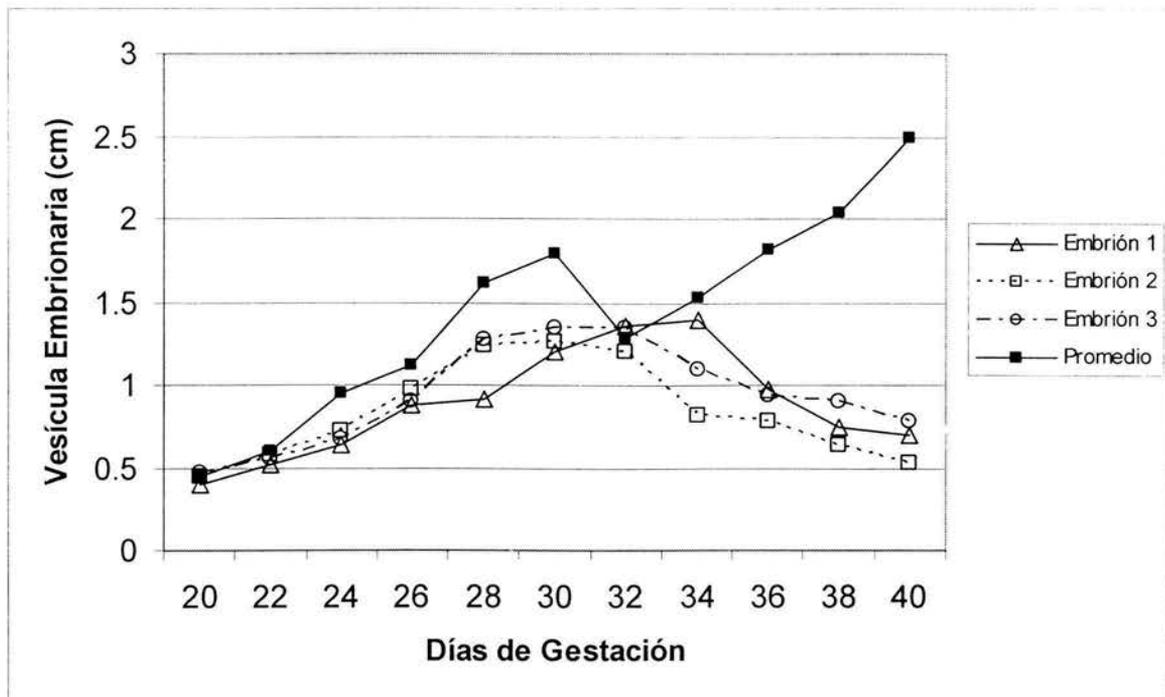


Figura 4. Desarrollo promedio de la vesícula embrionaria en comparación con tres casos de muerte embrionaria ocurrida entre los días 30-36 de gestación.

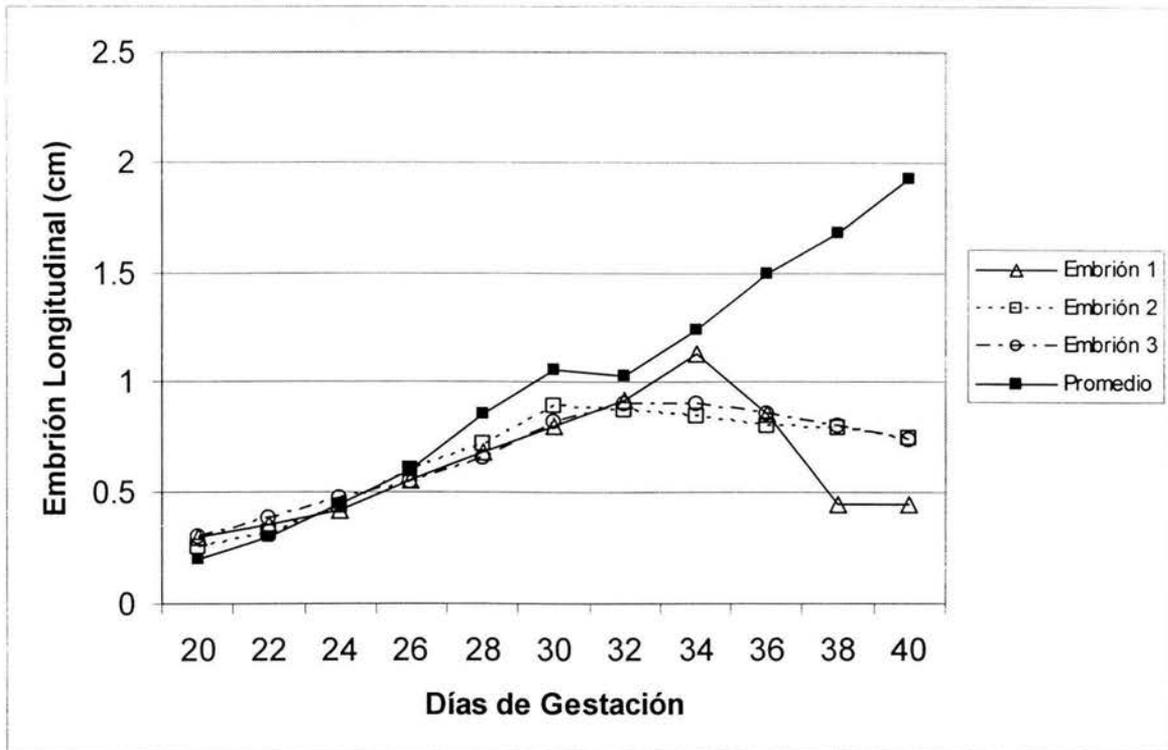


FIGURA 5. Curva de desarrollo embrionario longitudinal promedio comparada con casos de muerte embrionaria en ganado *B. indicus*.

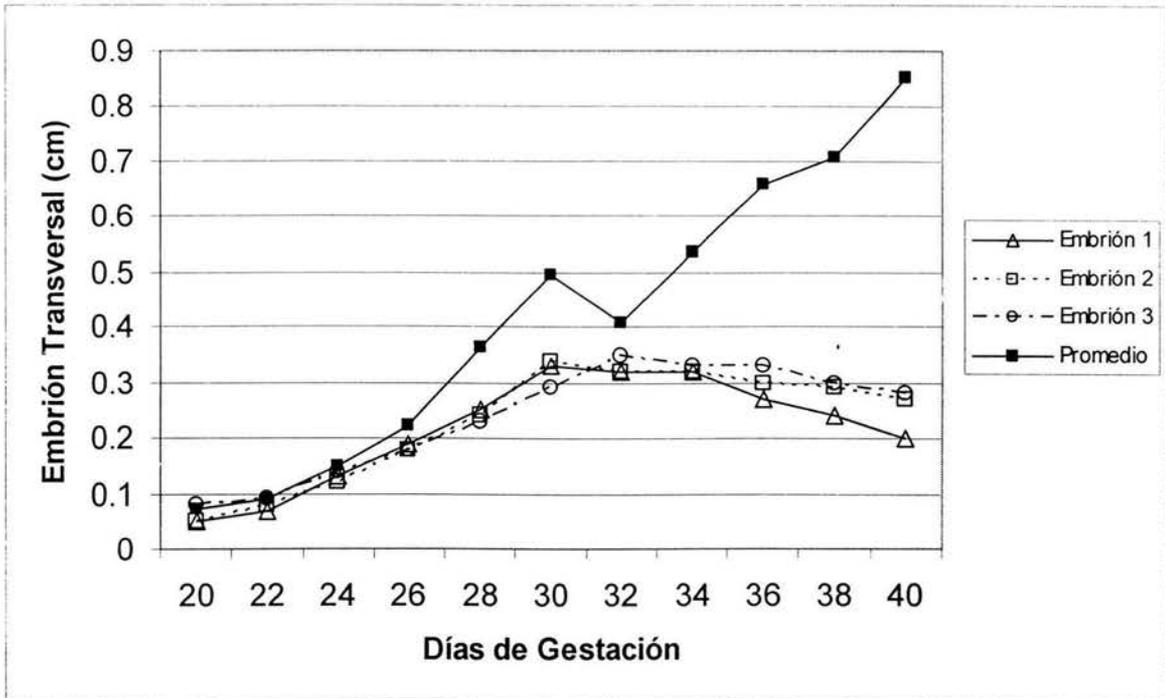


FIGURA 6. Curva de desarrollo embrionario trasversal promedio comparada con casos de muerte embrionaria en ganado *B. indicus*.