



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y SERVICIO EN ZOOTECNIA POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

DESARROLLO DE UN NUEVO DISPOSITIVO PARA INSEMINAR VACAS EN LA BASE DEL CUERNO UTERINO

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

Oswaldo García Peña

Bajo la supervisión de: **Raymundo Rangel Santos, Ph.D.**



REGISTRO NACIONAL DE ACADÉMICOS
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



Junio 2016

Chapingo, Estado de México

DESARROLLO DE UN NUEVO DISPOSITIVO PARA INSEMINAR VACAS EN
LA BASE DEL CUERNO UTERINO

Tesis realizada por **OSWALDO GARCÍA PEÑA** bajo la supervisión del Comité
Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para
obtener el grado de:

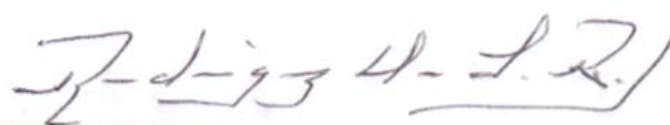
MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR: Raymundo Rangel S.

Ph.D. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

ASESOR: 

Dr. CARLOS ANTONIO APODACA SARABIA

ASESOR: 

Ph.D. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Inseminación artificial	3
2.2 Uso del semen sexado en la inseminación artificial	3
2.2.1 Uso en vaquillas y tasa de preñez.....	4
2.2.2 Estrategias para mejorar la tasa de preñez del semen sexado.....	4
Uso de tratamientos hormonales	5
Modificaciones al protocolo de sexado de semen	5
Concentración espermática por dosis	6
Sitio de aplicación	6
2.3 Uso de la laparoscopia en reproducción animal	8
2.3.1 Equipo de laparoscopia.....	9
Sistema óptico.....	9
Laparoscopio	9
Fuente de luz.....	10
Cable de luz.....	10
Sistema de insuflación	10
Material para laparoscopia.....	11

2.3.2	Técnica de laparoscopia	11
	Preparación de los animales	12
	Anestesiado de los animales.....	12
	Posición de los animales.....	12
	Técnica quirúrgica.....	13
	Manejo post-operatorio	13
2.3.3	Aplicaciones de la laparoscopia en manejo reproductivo.....	14
	Anatomía y fisiología reproductiva	14
	Inseminación artificial.....	15
	Aspiración folicular	16
	Uso en recolección y transferencia de embriones.....	16
	Recolección y transferencia de embriones en cabras y ovejas	16
	Recolección y transferencia de embriones en bovinos.....	17
	Otras aplicaciones.....	17
3.	LITERATURA CITADA	19
4.	A New Device to Inseminate Cows at the Base of the Uterine Horns	29
4.1	Content.....	29
4.2	Introduction.....	29
4.3	Materials and methods	30
4.3.1	Animals, housing and management	30
4.3.2	Development of the Chapingo device.....	31
4.3.3	Estrus synchronization and estrus detection	32

4.3.4	Artificial insemination procedure by transvaginal laparoscopy	32
4.3.5	Diagnosis of pregnancy	34
4.4	Results.....	35
4.5	Discussion	36
4.5.1	Aknowledgements	36
4.5.2	Conflicts of interest.....	36
4.5.3	Contribution of the authors	36
4.6	References	36

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Components of the anterior section of the Chapingo device.....	31
Fig. 2. Components of the posterior section of the Chapingo device.....	32
Fig. 3. Laparoscopy instruments: a) laparoscope, b) universal cannula, c) working channel, d) pyramidal tip plunger, and e) round tip plunger.....	33
Fig. 4. Position of the laparoscopy instruments at the time of semen application at the base of the uterine horn.....	34
Fig. 5. Pregnancy of 30 days obtained by transvaginal laparoscopic insemination.....	35

ABREVIATURAS USADAS

Abreviatura	Significado
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
h	Horas
IA	Inseminación artificial
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
kg	Kilogramos
L	Litros
LOPU	Laparoscopía en la aspiración folicular
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PM	Pieza metálica de punta roma
PV	Peso vivo
SS	Semen sexado
TRA	Técnicas de reproducción asistida
UI	Unidades internacionales
W	Watts

ABBREVIATIONS USED

Abbreviation	Meaning
°C	Celsius degrees
µg	Micrograms
AI	Artificial insemination
CIDR	Intravaginal device
cm	Centimeters
d	Day
Fig	Figure
G	Gages
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
gr	Grams
h	Hours
IM	Intramuscular
kg	Kilograms
L	Liters
mg	Milligram
MHz	Megahertz
min	Minutes
mL	Milliliters
N	North
PT	Plastic tube
RT	Round tip
SS	Sexed semen
TL	Transvaginal laparoscopy
W	West

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis papás, Judith Peña Moreno y Agustín García Peña, y a mi hermano Benjamín. Estoy muy orgulloso de ustedes, son el mejor ejemplo para mí. Gracias por darme tanto a cambio de tan poco, no me alcanzaría la vida para agradecerles. De todo corazón, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece el apoyo brindado para la realización de este trabajo a:

- Universidad Autónoma Chapingo
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
- Departamento de Zootecnia
- Posgrado en Producción Animal
- Granja Experimental
- Laboratorio de Reproducción Animal

Un agradecimiento muy especial al Ph.D. Raymundo Rangel Santos, por sus valiosas enseñanzas a lo largo de todos estos años, por ser un gran ejemplo a seguir y por todo su apoyo para la realización de la presente tesis.

A los profesores: Ph.D. Raymundo Rodríguez De Lara, Dr. Carlos A. Apodaca Sarabia y Dra. Emma de Jesús Maldonado Simán, por sus oportunas observaciones y aportes al artículo científico y al documento de tesis.

A Yesenia López Del Valle. Por su valiosa amistad y compañía durante todo este tiempo, por apoyarme en todo, por ser una gran mujer, y sobre todo por el hecho de haberla conocido. Gracias Chenia.

A Juan González Maldonado. Por ser un gran amigo y ejemplar compañero, por sus valiosas enseñanzas y apoyo incondicional.

A Ricardo Enríquez López. Por su amistad y todo el apoyo brindado durante la fase de campo.

A mis profesores y compañeros del Posgrado en Producción Animal.

Sinceramente, muchas gracias a todos.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre Oswaldo García Peña

Fecha de nacimiento 10 de mayo de 1988

Lugar de nacimiento La Pila de los Árboles,
Acámbaro, Guanajuato, México

No. Cartilla Militar D-0161479

CURP GAPO880510HGTRXS09

Profesión Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia

Cédula profesional 08764291



Desarrollo académico

Bachillerato Video Bachillerato San Diego de Alcalá, Guanajuato, México

Licenciatura Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma
Chapingo, México

Maestría Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma
Chapingo, México

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los altos niveles de producción, problemas sanitarios y el estrés climático, han ocasionado que la vida productiva de las vacas lecheras se reduzca, llevando a un incremento en la tasa de reemplazo, alcanzando cifras entre el 30 y 40% de reemplazo anual (Rogel y Tamayo, 2007; Hernández, 2011). Con el fin de cubrir la demanda de vaquillas de reemplazo, se ha optado por el uso de semen sexado (SS) durante la inseminación artificial (IA; Norman *et al.*, 2010). Anualmente se comercializan cerca de 20 millones de dosis de SS en Estados Unidos (Seidel, 2014). No obstante, la fertilidad obtenida ha sido relativamente baja, con porcentajes de preñez en vacas y vaquillas de 46 y 27%, respectivamente (DeJarnette *et al.*, 2008).

La baja fertilidad del SS ha sido explicada por múltiples factores, entre los que destacan: el proceso de sexado, el cual pudiera llegar a ocasionar daño celular; el contenido de espermatozoides por dosis de SS, inferior al de una dosis de semen convencional (2.1×10^6 vs. $15\text{-}20 \times 10^6$); la eficiencia en la detección de celos, que sumada a las anteriores pudiese impactar negativamente en la tasa de fertilidad (Grant y Chamley, 2007; Kurykin *et al.*, 2007; Frijters *et al.*, 2009). En las últimas décadas se han desarrollado estrategias para tratar de mejorar la fertilidad del SS, éstas implican el uso de hormonas, incremento del número de servicios y concentración de espermatozoides por dosis, sin obtenerse resultados satisfactorios (Sá Filho *et al.*, 2010). Sin embargo, Kurykin *et al.* (2007) mencionaron que el sitio de aplicación de semen influye en la tasa de concepción, siendo mayor al aplicarse cerca de la parte media del cuerno uterino.

En estudios realizados por Meirelles *et al.* (2012), en los que se evaluó la fertilidad del SS depositado en diferentes sitios durante la IA, se obtuvieron porcentajes de preñez de 67.4 y 48.8% al aplicar el semen en la parte media del cuerno uterino y el cuerpo del útero, respectivamente. Por su parte, Kurykin *et al.* (2003) estimaron que la tasa de preñez en vaquillas inseminadas en la parte media del cuerno uterino con 2×10^6 espermatozoides y en el cuerpo del útero con 40×10^6 espermatozoides, no fue diferente, lo cual demuestra que el sitio de aplicación

del semen no sólo influye en la tasa de gestación, sino también en la cantidad de espermatozoides, por dosis, necesarios para producir una gestación. Sin embargo, Hunter (2003) ha sugerido que la IA intracornual profunda presenta desventajas, debido al uso del aplicador rígido para inseminar, pudiéndose ocasionar la ruptura del folículo preovulatorio, lesiones e incluso perforación de la pared uterina.

La laparoscopia ha sido utilizada exitosamente en el manejo reproductivo de pequeños rumiantes, principalmente en la IA donde se mencionan tasas de preñez de entre 60 y 75% (Martinez *et al.* 2009; Dovenski *et al.*, 2012; Anakkul *et al.*, 2014), no obstante, aunque existen reportes de algunos estudios donde se ha utilizado la laparoscopia en el monitoreo de estructuras del tracto reproductivo en bovinos (Babkine y Desrochers, 2005), es escasa la información disponible con respecto a su uso en la IA. Recientemente se han reportado resultados satisfactorios del uso de la laparoscopia transvaginal en la recuperación de embriones en bovinos (Besenfelder *et al.*, 2008), lo cual sugiere la posibilidad de utilizar dicho procedimiento para realizar IA.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Inseminación artificial

La IA fue una de las primeras biotecnologías aplicadas en la mejora genética y reproductiva de animales de granja, teniendo un enorme impacto, principalmente en ganado lechero (Foote, 2002). La IA puede definirse como una herramienta para la aplicación de semen en el tracto genital de la hembra en el momento efectivo para la fecundación (Giraldo, 2007). Aunque existen historias indocumentadas de IA en yeguas por los árabes, fue en 1936 cuando se estableció el método recto-vaginal de fijación del cérvix. Hacia 1946 Sorensen inventó las pajillas para empacar semen (Foote, 2002; Giraldo, 2007), y en 1960 se estableció el depósito transcervical del semen en el cuerpo del útero (Heise, 2012).

Es innegable la relevancia de la IA en el mejoramiento de parámetros reproductivos y productivos de la ganadería mundial. Sin embargo, la tasa de fertilidad lograda con esta técnica es baja con respecto a la monta (Pursley *et al.*, 1997). Morales *et al.* (2000), mencionaron que el porcentaje de concepción en vacas a primer servicio es 34%, 35% en vacas repetidoras y 59% en vaquillas inseminadas. DeJarnette *et al.* (2008) reportaron tasas de preñez en vacas y vaquillas de 30 y 59%, respectivamente, al ser inseminadas con semen convencional.

2.2 Uso del semen sexado en la inseminación artificial

En las últimas décadas se ha observado un incremento en la tasa de desecho en los establos lecheros y con ello en la demanda de vaquillas de reemplazo (Rogel y Tamayo, 2007). Con el objetivo de cubrir la demanda de reemplazos se ha optado por usar SS en la IA (Rath y Johnson, 2008; Norman *et al.*, 2010). Se estima que anualmente se comercializan en Estados Unidos de América cerca de dos millones de dosis de SS, que representan casi 5% del volumen de ventas de semen de bovino (Seidel, 2014). El uso del SS ha permitido mejorar la rentabilidad de los establos lecheros mediante el incremento de hembras genéticamente superiores, nacidas después de la IA, aunque la fertilidad

obtenida es inferior a la del semen convencional (46 vs. 70%; Bodmer *et al.*, 2005; Mallory *et al.*, 2013). Guerino *et al.* (2013) sugirieron que la menor fertilidad del SS puede ser consecuencia del proceso mismo de sexado, y del bajo número de espermatozoides por dosis con respecto al semen convencional (2×10^6 vs. 20×10^6).

2.2.1 Uso en vaquillas y tasa de preñez

La aplicación comercial del SS se ha limitado principalmente a vaquillas, por ser más fértiles que las hembras adultas (Garner y Seidel, 2008). En estudios realizados por Dejarnette *et al.* (2008) se encontraron diferencias significativas en las tasas de preñez de vaquillas con respecto a vacas (46 vs. 27%). Por otro lado, Guerino *et al.* (2013) reportaron 44 y 23% de preñez en vaquillas y vacas inseminadas con SS. Resultados similares fueron publicados por Mellado *et al.* (2013), quienes reportaron tasas de preñez para vacas y vaquillas de 17 y 44%, respectivamente, demostrándose la importancia de utilizar SS en vaquillas.

Se ha demostrado que la baja tasa de preñez del SS es en parte consecuencia del proceso de sexado y el bajo número de espermatozoides por dosis (Seidel y Schenk, 2008). Dejarnette *et al.* (2008) evaluaron el efecto del número de espermatozoides por dosis, obteniéndose diferencias significativas en la tasa de preñez de vaquillas, 46 y 59% al inseminar con 2.1 y 5×10^6 , respectivamente. Datos reportados por Guerino *et al.* (2013) mostraron una tendencia similar, ellos obtuvieron 44, 46 y 61% de preñeces en vaquillas inseminadas con 2.1 , 3.5 y 15×10^6 de espermatozoides por dosis.

2.2.2 Estrategias para mejorar la tasa de preñez del semen sexado

Se ha demostrado que el número de espermatozoides por pajilla, la calidad del semen, el sitio de aplicación y el tiempo de la IA con relación a la manifestación del celo pueden afectar negativamente la tasa de preñez, al utilizar tanto SS como convencional (Schenk *et al.*, 2009; Norman *et al.*, 2010; Sá Filho *et al.*, 2010). No obstante, se han evaluado estrategias para tratar de mejorar la fertilidad del SS, como son: uso de tratamientos hormonales, modificaciones al protocolo de

sexado de semen, cambios en la concentración de espermatozoides por dosis y el sitio de aplicación al momento de inseminar.

Uso de tratamientos hormonales

Las gonadotropinas exógenas se han usado para manipular el ciclo reproductivo de las hembras, permitiendo optimizar la detección del celo y el momento de la inseminación, sin embargo, los resultados no han sido consistentes (Kaim *et al.*, 2003). Sá Filho *et al.* (2010) evaluaron el efecto de la aplicación de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), al momento de detectar el celo, en vaquillas inseminadas con SS, estos autores no reportaron diferencias en la tasa de preñez de vaquillas tratadas y no tratadas con GnRH (53 vs. 49%). Por otra parte, Abdel-Azim (2010) sostiene que la sincronización del celo en hembras inseminadas con SS reduce la tasa de preñez. Mallory *et al.* (2013) evaluaron la eficiencia de un programa de inseminación a tiempo fijo con SS, estos autores reportan diferencias en la tasa de preñez de hembras inseminadas a celo detectado con respecto a las que se inseminaron a tiempo fijo (46 vs. 26%, respectivamente).

Modificaciones al protocolo de sexado de semen

El proceso de citometría de flujo para el sexado de semen induce daños en el espermatozoide que afectan su función y habilidad de fertilización (Klinc y Rath, 2007; Rath y Johnson, 2008; Vazquez *et al.*, 2008; Rath *et al.*, 2009; Espinosa-Cervantes y Córdova-Izquierdo, 2013). En la última década se han aplicado modificaciones al proceso de citometría de flujo, encaminados a optimizar la fertilidad del SS (Vazquez *et al.*, 2008). Klinc y Rath (2007) sugirieron la suplementación con antioxidantes mejora la calidad del SS, reduciendo el daño al acrosoma y la membrana, y mejorando su motilidad. Recientemente Rath *et al.* (2009) reportaron modificaciones al método de sexado de semen, los cuales permiten prolongar la longevidad de los espermatozoides después de la descongelación, reportándose tasas de preñez similares a las obtenidas con semen convencional (73.6 vs. 76.7%). Sin embargo, las modificaciones al proceso de sexado han tenido poco impacto en la tasa de preñez del SS a nivel

comercial (Sá Filho *et al.*, 2010; Guerino *et al.*, 2013; Mallory *et al.*, 2013; Mellado *et al.*, 2013).

Concentración espermática por dosis

La tasa de sexado del semen por citometría de flujo es relativamente baja ($9\text{--}14 \times 10^6$ de espermatozoides h^{-1}), y por tanto la cantidad de espermatozoides por dosis es de entre 1 y 6×10^6 (2.1×10^6 el promedio). Sin embargo, dicha concentración reduce la tasa de preñez en vaquillas (Schenk *et al.*, 2009), planteándose el uso de dosis más concentradas para mejorar la tasa de preñez (Seidel y Schenk, 2008). Seidel *et al.* (1999) evaluaron el efecto de la concentración espermática en la tasa de preñez de vaquillas, obteniendo mejores resultados al inseminar con dosis más concentradas (3×10^6 : 60% vs. 1.5×10^6 : 52%). Dejarnette *et al.* (2008) reportan tasas de preñez consistentes con la concentración espermática, las cuales fueron significativamente diferentes, (2.1×10^6 : 47%, 3.5×10^6 : 51% y 5×10^6 : 52%). Sin embargo, Seidel y Schenk (2008) no reportaron diferencias significativas en la tasa de vaquillas inseminadas con 6×10^6 de espermatozoides con respecto a las que se inseminaron con 1.5×10^6 (41 vs. 43%), de igual manera, en estudio realizado por Dejarnette *et al.* (2010) donde se evaluó el efecto de dos concentraciones espermáticas en la tasa de preñez de vaquillas, no se encontraron diferencias significativas (2.1×10^6 : 44% vs. 3.5×10^6 : 46%).

Sitio de aplicación

La aplicación del semen tradicionalmente se realiza en el cuerpo del útero, aunque se sugiere que el sitio de aplicación se cambie a los cuernos uterinos ya que con ello se garantizaría un reservorio preovulatorio de espermatozoides en la unión uterotubárica, permitiendo incluso reducir la cantidad de espermatozoides necesarios para generar una preñez (Hunter y Greve, 1998; López-Gatius, 2000; Carvalho *et al.*, 2013). Además, con la aplicación intracornual del semen se reduciría la pérdida espermática por transporte retrogrado o por fagocitosis durante la migración uterina (Meirelles *et al.*, 2012).

Existen diversos estudios que demuestran el efecto del sitio de aplicación del semen en la tasa de preñez. Senger *et al.* (1988) reportaron 65 y 45% de concepciones al inseminar en los cuernos uterinos y el cuerpo del útero, respectivamente. Resultados similares encontraron Seidel *et al.* (1999) al inseminar vaquillas con SS en el cuerpo del útero y los cuernos uterinos (40 vs. 62%). También Meirelles *et al.* (2012), reportan mayores tasas de preñez al aplicar el semen en los cuernos uterinos en comparación con el cuerpo del útero (67 vs. 49%).

En un estudio realizado por Seidel *et al.* (1999) se evaluó la influencia de dos concentraciones de SS (1.5 y 3×10^6 espermatozoides) y dos sitios de aplicación (cuerpo del útero y cuernos uterinos) en la tasa de preñez de vaquillas, siendo ésta superior al aplicar el semen en los cuernos uterinos; cuerpo del útero: $1.5 \times 10^6 = 52\%$ y $3 \times 10^6 = 60\%$, cuernos uterinos: $1.5 \times 10^6 = 60\%$ y $3 \times 10^6 = 68\%$. Por otro parte, Kurykin *et al.* (2003) evaluaron el efecto del sitio de aplicación del semen y la concentración espermática en la tasa de preñez de vaquillas, estos autores no reportaron diferencias entre vaquillas inseminadas en el cuerpo del útero con 40×10^6 de espermatozoides y las inseminadas en los cuernos uterinos con 2×10^6 de espermatozoides (66 vs. 68%, respectivamente). Sin embargo, Andersson *et al.* (2003) reportaron porcentajes de preñez similares al aplicar dosis de SS (2×10^6 espermatozoides) en el cuerpo del útero (31%) y la parte media de los cuernos uterinos (32%).

Los estudios de la literatura reflejan la influencia del sitio donde se aplica el semen en la tasa de preñez y en la cantidad de espermatozoides requerida para generar una gestación. Sin embargo, aunque la aplicación de semen en los cuernos uterinos pudiera considerarse como una alternativa para mejorar la fertilidad y optimizar el uso del SS, ésta presenta diversas desventajas, como la posible ruptura del folículo preovulatorio, lesiones y en algunos casos la perforación de la pared uterina (Hunter, 2003). Williams *et al.* (1987) sugieren que por la forma rígida del aplicador se provocan daños en el endometrio durante la inseminación, que pueden favorecer la presencia de infecciones y bajos porcentajes de preñez. Una alternativa para realizar la aplicación de semen en

los cuernos uterinos es la laparoscopia, pues ésta ha demostrado ser una técnica mínimamente invasiva y eficiente en el manejo reproductivo de pequeños rumiantes (Dovenski *et al.*, 2012). Además, recientemente De Graaf *et al.* (2007) reportaron porcentajes de fertilidad aceptables (61-66%), en ovejas inseminadas por laparoscopia con SS, sugiriendo a esta técnica como una alternativa factible para realizar IA con SS en vacas.

2.3 Uso de la laparoscopia en reproducción animal

La laparoscopia (del griego: *Laparo*=abdomen, *Scopein*=examinar) es una técnica mínimamente invasiva que permite la visualización de las estructuras contenidas en la cavidad abdominal (Monnet y Twedt, 2003; Bouré, 2005; Vilos *et al.*, 2007; Dovenski *et al.*, 2012). La técnica requiere de la inserción de una cánula a través de la pared abdominal, la distensión de ésta con gas o aire (pneumoperitoneo), así como la visualización y examinación del contenido abdominal con un telescopio rígido (laparoscopio) provisto de luz y que permite al técnico poder inspeccionar las vísceras y la superficie peritoneal (Platt *et al.*, 1998; Bouré, 2005).

En 1901, Kelling reportó la primera exploración de la cavidad abdominal de un perro con un cistoscopio insertado a través de una incisión cutánea, y en 1910 Jacobeus realizó la primera exploración laparoscópica en humanos (Bouré, 2005). Desde entonces, gracias al rápido avance tecnológico y al desarrollo de la microtecnología, la laparoscopia pasó de ser una técnica para diagnóstico a una disciplina quirúrgica empleada tanto en medicina humana como animal (Babkine y Desrochers, 2005; Vilos *et al.*, 2007; Shettko y Hendrickson, 2008). El uso de la laparoscopia en bovinos se ha descrito desde mediados de 1930, aunque fue hasta 1970 que ésta se usó para la observación del tracto reproductivo y la exploración de su fisiología (Bouré, 2005). En ovejas, la primera laparoscopia fue reportada en 1968 por Roberts y fue realizada para observar los órganos reproductivos (Dovenski *et al.*, 2012).

Las tecnologías de reproducción asistida (TRA), en los últimos 30 años, se han apoyado en el uso de la laparoscopia para incrementar la producción de animales

de alto valor genético (Baldassarre y Karatzas, 2004; Dovenski *et al.*, 2012). Técnicas de inseminación artificial, recolección y transferencia de embriones, aspiración folicular, monitoreo de la actividad ovárica, así como biopsia y extirpación de algunos órganos asociados al comportamiento reproductivo, han sido algunas de las aplicaciones de la laparoscopia en el manejo reproductivo de varias especies animales (Bernard *et al.*, 1984; Fayrer-Hosken *et al.*, 1989; Monnet y Twedt, 2003; Bleul *et al.*, 2005; Aziz *et al.*, 2008; Padilha *et al.*, 2014).

2.3.1 Equipo de laparoscopia

El equipo básico requerido para laparoscopia incluye una lente (laparoscopio), una cánula y un trócar (correspondiente al diámetro de la lente), una fuente de luz, un sistema de insuflación, así como pinzas y fórceps. Las características de los instrumentos (largo, grosor, ángulo de visión, etc.) dependerán en gran medida de la especie animal con que se esté trabajando y la técnica de laparoscopia que se realice (Ragle, 2002; Monnet y Twedt, 2003; Babkine y Desrochers, 2005; Bouré, 2005; Dovenski *et al.*, 2012).

Sistema óptico

El sistema óptico consiste de un laparoscopio, una fuente de luz y un cable de fibra o luz. Los laparoscopios pueden ser rígidos o flexibles, aunque son los rígidos los de mayor uso en las TRA en animales, ya que proveen mayor iluminación de la cavidad, campo y claridad de visión. (Monnet y Twedt, 2003; Babkine y Desrochers, 2005; Bouré, 2005).

Laparoscopio

El laparoscopio está compuesto por un tubo de metal externo, un canal óptico y una fibra óptica. El canal óptico está integrado por una serie de lentes que transmiten la imagen a un ocular, que puede ser observado a simple vista o mediante una cámara adaptada a éste. La fibra óptica permite la transmisión de luz desde una fuente para iluminar las estructuras intra-abdominales. Los laparoscopios pueden ser de dos categorías: para diagnóstico u operación. Los de diagnóstico son los más utilizados, pues permiten realizar procedimientos quirúrgicos. Los de operación cuentan con un canal adicional para la inserción

de instrumentos. De igual manera, los laparoscopios pueden diferenciarse por sus dimensiones y ángulo de visión. Los diámetros más comunes son: 2, 5, 8 y 10 mm; mientras que los ángulos de visión son: 0°, 30°, 45° y multi-ángulo. (Ragle, 2002; Monnet y Twedt, 2003; Babkine y Desrochers, 2005; Bouré, 2005; Dovenski *et al.*, 2012).

Fuente de luz

La cavidad abdominal debe ser iluminada para realizar una laparoscopia, por lo que se utilizan fuentes de luz extracorpóreas y cables de luz fría que conectan la fuente de luz con el laparoscopio. Las fuentes de luz disponibles pueden ser de tungsteno, halógeno y xenón. Se recomienda utilizar fuentes de luz de xenón de 300 Watts (W), cuando se realicen trabajos en bovinos o equinos, mientras que en procedimientos con cabras, cerdos y ovejas, una de 150 W puede ser utilizada (Ragle, 2002; Monnet y Twedt, 2003; Babkine y Desrochers, 2005; Bouré, 2005; Dovenski *et al.*, 2012).

Cable de luz

Los cables de luz conectan a la fuente de luz con el laparoscopio. Ellos proveen una luz fría y de alta intensidad al interior de la cavidad abdominal. Los cables de luz están fabricados de segmentos de fibra óptica unidos por resina epoxi. La fibra óptica transporta la luz con una mínima pérdida de intensidad sin generar calor. Para una máxima visualización se recomienda que el diámetro del cable de luz sea de 6 mm en bovinos o equinos y 4.5 mm en especies menores (Ragle, 2002; Monnet y Twedt, 2003; Babkine y Desrochers, 2005; Bouré, 2005; Dovenski *et al.*, 2012).

Sistema de insuflación

El sistema de insuflación permite la creación de un pneumoperitoneo, el cual separa la pared corporal de los órganos abdominales, de tal manera que el cirujano o técnico pueda observarlos y trabajar dentro de la cavidad abdominal. Insufladores automáticos de alto flujo ($>10 \text{ L min}^{-1}$), son usualmente utilizados para insuflar el abdomen de los bovinos. El volumen de gas en el interior de la cavidad varía de 5 a 35 L, no obstante, hay quienes sugieren que el mejor

indicador de la cantidad de gas es la formación del espacio de visión y la distensión de los flancos (Holthausen *et al.*, 1999; Monnet y Twedt, 2003; Babkine y Desrochers, 2005; Bouré, 2005). El CO₂ es el gas más utilizado para la insuflación, ya que es relativamente más barato y no causa embolia gaseosa, comparado con el óxido nitroso, el aire y el helio. La principal desventaja del CO₂ es cuando se convierte en ácido carbónico en la superficie peritoneal, ocasionando malestar post-operatorio (Holthausen *et al.*, 1999).

Material para laparoscopia

Existen diferentes instrumentos para cirugía de un mínimo de 40 cm utilizados en animales de talla pequeña principalmente. En el caso de bovinos y equinos, se requieren instrumentos de 10 mm de diámetro, especialmente cuando los órganos son manipulados, sujetos o retraídos (Ragle, 2002; Babkine y Desrochers, 2005). En procedimientos exploratorios o laparoscopías simples se pueden utilizar fórceps Babcock, Kelly y tijeras Metzenbaum (Bouré, 2005). Independientemente de la especie, es necesario tener una cánula con émbolo, a través de la cual se introduce el laparoscopio al interior de la pared abdominal o la cavidad. La cánula y el émbolo pueden ser de diversas dimensiones, que dependerán principalmente de la especie animal y los instrumentos que se utilicen (Monnet y Twedt, 2003; Bouré, 2005). En procedimientos quirúrgicos más complejos, por ejemplo: recolección y transferencia de embriones en ovejas por métodos quirúrgicos u ovariectomías, es necesario contar con material para suturar, ya sea de manera manual o electroquirúrgica con pinzas cauterizantes (Baldassarre *et al.*, 1994; Bleul *et al.*, 2005; Aziz *et al.*, 2008; Dovenski *et al.*, 2012).

2.3.2 Técnica de laparoscopia

La técnica de laparoscopia es similar en todas las especies, difiriendo principalmente por la vía en que se realizan, es decir la parte del cuerpo por donde se ingrese a la cavidad abdominal. Los pasos a seguir antes, durante y después de la laparoscopia son semejantes, únicamente varían dependiendo de

la especie o el tipo de operación a realizar (Boure, 2005; Shetko y Hendrickson, 2008; Vilos *et al.*, 2007).

Preparación de los animales

En todas las especies es recomendado restringir el consumo de agua y alimento previo a la intervención, hay quienes sugieren 36 a 48 h, esto con el objetivo de evitar lesionar el aparato digestivo o urinario durante la intervención y facilitar la formación del pneumoperitoneo, así como evitar la muerte por asfixia, cuando la vía de acceso es ventral (Ambrose *et al.*, 1993). Aunque, una restricción de 16 a 24 h también es adecuada (Tapia *et al.*, 2001; Babakine y Destochers, 2005; Dovenski *et al.*, 2012).

Anestesiado de los animales

Antes de iniciar con la laparoscopia se aplica al animal algún tranquilizante, en bovinos se aplican 0.05 mg kg⁻¹ de peso vivo (PV) de xilacina vía IM, o IV si se desea acelerar el tiempo de acción, mientras que el sitio de acceso de la cánula y trocar (vía paralumbar o ventral) es anestesiado mediante la infiltración local de lidocaína 2% (Babkine y Desrochers, 2005), aunque cuando la vía es transvaginal se aplican 5 mL de ésta vía epidural (Besenfelder y Brem, 1998). En el caso de cabras se recomienda aplicar 0.1 mg kg⁻¹ de PV de xilacina y 4 mg kg⁻¹ de PV de Quetamina, ambas por vía IV, así como una aplicación local de lidocaína 2% en los sitios de ingreso del trocar, cánulas y aire (Anakkul *et al.*, 2014). En ovejas se sugiere la aplicación de 0.22 mg kg⁻¹ de PV de xilacina y 5 min después 11.0 mg kg⁻¹ de PV de quetamina, ambas por vía IM. La xilacina-quetamina produce un buen efecto anestésico, que puede mantenerse mediante el suministro de oxígeno-halotano por intubación craneal (Ishwar y Memon, 1996). En el caso de los equinos se recomienda aplicar 1 mg kg⁻¹ de PV de clorhidrato de xilacina por vía IV y 20 mL de lidocaína 2% por infiltración directa en el sitio de ingreso a la cavidad abdominal (Aziz *et al.*, 2008).

Posición de los animales

Los animales anestesiados se colocan en una camilla para laparoscopia (ovejas, cabras y cerdos) o se mantienen en una trampa de manejo (vaca y yegua). En

cabras, ovejas y cerdas generalmente el ingreso es mediante la vía ventral, colocando al animal en posición dorsal recumbente con la cabeza hacia abajo (posición trendelenburg), en un ángulo de inclinación de aproximadamente 30° (Scudamore *et al.*, 1991; Tapia *et al.*, 2011; Dovenski *et al.*, 2012). En bovinos y equinos se ha usado la vía paralumbar (Holland *et al.*, 1981; Bernard *et al.*, 1984; Ragle, 2002; Babakine y Destochers, 2005), aunque también se han sugerido las vías transvaginal (Tervit, 1996; Besenfelder y Brem, 1998; Wetscher *et al.*, 2005) y ventral (Holland *et al.*, 1981). En las primeras dos vías el animal permanece en posición cuadrúpeda, mientras que en la vía ventral es suspendido en el aire mediante la sujeción de las extremidades (Holland *et al.*, 1981; Wetscher *et al.*, 2005).

Técnica quirúrgica

El área donde se introducen los instrumentos debe ser lavada, desinfecta y rasurada (Tapia *et al.*, 2001). Antes de introducir algún instrumento (émbolo, cánula, fórceps, laparoscopio, etc.) se debe formar el pneumoperitoneo, mediante la aplicación de aire o CO₂ con una aguja de Veress o una cánula que atraviese la pared abdominal, esto en el caso de laparoscopías por la vía ventral o paralumbar (Bouré, 2005). Posteriormente se procede a introducir la cánula y el émbolo en el sitio seleccionado para acceder a la cavidad abdominal (vientre, fosa paralumbar o saco vaginal) (Besenfelder y Brem, 1998; Babkine y Desrochers, 2005). En seguida el émbolo es reemplazado por el laparoscopio y dependiendo del procedimiento que se desee realizar se pueden introducir otras cánulas para otros instrumentos como serían: fórceps, manipuladores, tijeras, cauterizadores, áspic para inseminación, entre otros (Babkine y Desrochers, 2005; Bouré, 2005).

Manejo post-operatorio

Al concluir la laparoscopía, en algunos casos es necesario desinflar la cavidad abdominal y de ser necesario suturar el sitio por donde se introdujo la cánula con el laparoscopio, así como aplicar antibiótico y analgésico (Fayrer-Hosken *et al.*, 1989). En bovinos se considera adecuada la aplicación de antibiótico durante los

tres días posteriores a la laparoscopia (Ambrose *et al.*, 1993). En cabras se recomienda aplicar 20 000 UI kg⁻¹ de PV de penicilina-estreptomicina y 4 mg kg⁻¹ de PV de fenilbutazona que actúa como analgésico, ambas aplicadas por la vía IM. En equinos la aplicación de 10 000 UI kg⁻¹ de PV de penicilina y 10 mg kg⁻¹ de PV de estreptomicina, ambas por vía IM, es recomendada durante cuatro días a partir de la intervención quirúrgica, así como un monitoreo continuo durante un mes (Aziz *et al.*, 2008).

2.3.3 Aplicaciones de la laparoscopia en manejo reproductivo

La aplicación de biotecnologías reproductivas se ha apoyado en técnicas que permiten incrementar su impacto, hacerlas más eficientes y de fácil aplicación. La laparoscopia ha sido usada en diferentes especies domésticas para el estudio anatómico y fisiológico de los órganos reproductivos, la IA, recolección y transferencia de embriones, aspiración folicular y diagnóstico de gestación, entre otras (Phillippo *et al.*, 1971; Carter *et al.*, 1981; Bernard *et al.*, 1984; Schiewe *et al.*, 1984; Besenfelder *et al.*, 1997; Besenfelder y Brem, 1998; Baldassarre y Karatzas, 2004; Dovenski *et al.*, 2012).

Anatomía y fisiología reproductiva

El uso de la laparoscopia permitió desde un principio la exploración del tracto reproductivo de la hembra, no obstante, hubo limitaciones en animales de talla mayor (tal es el caso de bovinos y equinos) debido a la pobre iluminación, aunque con el desarrollo de nuevos equipos y el uso de la técnica de laparoscopia paralumbar o vía ventral en bovinos (Holland *et al.*, 1981; Babkine y Desrochers, 2005), se pudo dar seguimiento a la actividad ovárica en bovinos y búfalos (Bernard *et al.*, 1984; Ambrose *et al.*, 1993), e inclusive en humanos (Lousse y Donnez, 2008). De igual manera se ha explorado la actividad ovárica en cabras y ovejas, permitiendo a los investigadores reconocer las estructuras presentes a lo largo del ciclo estral y tener una imagen en vivo del tracto reproductivo de la hembra (Kassem *et al.*, 2011).

La laparoscopia ha permitido también obtener fotografías de las estructuras presentes en el ovario, lo cual ayudó a entender mejor el proceso de ovulación,

la respuesta ovárica a la aplicación de hormonas en bovinos y la variación estacional de los órganos reproductivos (Lambert *et al.*, 1983; Bernard *et al.*, 1984). Además, el uso de la laparoscopia facilitó el monitoreo del efecto que cirugías laparoscópicas recurrentes podrían ocasionar en el ciclo estral de los bovinos, demostrándose que la laparoscopia no altera su función reproductiva (Carter *et al.*, 1981).

Inseminación artificial

La IA ha producido un gran impacto en la producción animal, pues ayuda a multiplicar características productivas deseables de reproductores de alto valor genético, especialmente cuando se trabaja con semen congelado (Tapia *et al.*, 2011). Sin embargo, el semen debe ser aplicado en la luz del útero para incrementar las tasas de preñez. En 1982, Killen y Caffery (1982) reportaron la primer IA por laparoscopia en ovejas, la cual ha generado mayores tasas de preñez comparativamente con la inseminación cervical y transcervical (IA laparoscópica: 81% vs. IA cervical: 67%; IA laparoscópica: 54% vs. IA transcervical 43%), en cabras y ovejas (Sohnrey y Holtz, 2005; Dovenski *et al.*, 2012).

Anakkul *et al.* (2014), mencionan que las principales ventajas de la IA laparoscópica frente a otras técnicas de inseminación son que permite la aplicación de semen en ambos cuernos uterinos aumentando la probabilidad de fertilizar el ovocito, y da certeza al inseminador de que el sitio donde se aplicó el semen sea el correcto. Sin embargo, la técnica debe realizarse de manera rápida, pues se ha demostrado que la manipulación prolongada del tracto reproductivo incrementa las concentraciones de PGF2 α , lo cual afecta la calidad del embrión y por ende disminuye la tasa de preñez (Scenna *et al.*, 2005). Actualmente existen reportes de IA laparoscópica en cabras y ovejas, donde las tasas de preñez oscilan entre 60 y 80%, siendo por lo tanto una excelente alternativa a la IA convencional o la monta natural (Martinez *et al.*, 2009; Tapia *et al.*, 2011; Alfaris *et al.*, 2012; Dovenski *et al.*, 2012; Anakkul *et al.*, 2014).

Aspiración folicular

La posibilidad de producir mediante fertilización *in vitro*, embriones y crías derivados de ovocitos obtenidos de ovarios de animales sacrificados, ha sido un importante avance en la investigación (Brackett *et al.*, 1982). En las últimas décadas esta tecnología ha sido aprovechada con fines comerciales, lo cual ha llevado a desarrollar técnicas que permiten obtener ovocitos de ovarios de animales vivos, sobresaliendo las técnicas basadas en ultrasonografía y laparoscopia (Fayrer-Hosken *et al.*, 1989; Baldassarre *et al.*, 1994; Reichenbach *et al.*, 1994; Baldassarre y Karatzas, 2004; Padilha *et al.*, 2014).

El uso de la laparoscopia en la aspiración folicular (LOPU), a diferencia del método por ultrasonografía, proporciona una mayor certeza de las estructuras que se están aspirando y facilita la aspiración de folículos pequeños. También es importante mencionar que la posibilidad de pérdida de folículos al aspirar y el daño al ovario se reduce al mínimo (Lambert *et al.*, 1983; Reichenbach *et al.*, 1994). La LOPU utilizada en conjunto con un sistema de aspiración provee tasas de recuperación de ovocitos de hasta 90% (Padilha *et al.*, 2014).

Uso en recolección y transferencia de embriones

Recolección y transferencia de embriones en cabras y ovejas

La técnica de transferencia de embriones por laparoscopia ha sido efectiva, segura y mínimamente invasiva. El acceso directo al útero para la recolección y transferencia de embriones en ovejas y cabras, había sido clásicamente por laparotomía quirúrgica, sin embargo, laparotomías constantes ocasionan traumatismo en los tejidos, incremento en adhesiones abdominales y reducción de la vida productiva (Schiewe *et al.*, 1984; Scudamore *et al.*, 1991; Nellenschulte y Nieman, 1992). La laparoscopia es menos invasiva, los sitios de incisión son menores con respecto a la laparotomía, la incidencia de infección bacteriana es reducida, así como la deshidratación del tejido y riesgo de adhesión, siendo posible realizar repetidas recolecciones y transferencias de embriones (Schiewe *et al.*, 1984; McKelvey *et al.*, 1986).

El uso de la laparoscopia ha generado tasas de recuperación de embriones de 75% (Nellenschulte y Nieman, 1992), 87% (Schiewe *et al.*, 1984) y 76% (McKelvey *et al.*, 1986). Sin embargo, aunque los resultados de la transferencia de embriones por laparoscopia han sido prometedores, hay cierta influencia del estadio de desarrollo de los embriones en la tasa de sobrevivencia, reportándose 29% para el estadio de mórula y 50% para blastocisto, por otra parte el número de embriones transferidos por receptora afecta la tasa de sobrevivencia, reportándose para cabras 52 y 65% y en ovejas 35 y 32%, al transferir 1 y 2 embriones, respectivamente (Ishwar y Memon, 1996).

Recolección y transferencia de embriones en bovinos

En 1989 Fayrer-Hosken *et al.* publicaron la primera transferencia de embriones por la vía paralumbar, aunque los resultados de transferir embriones producidos *in vitro* al oviducto no fueron completamente efectivos, 20% (1/5) de las crías nacieron, dando inicio a una serie de investigaciones para perfeccionar la técnica. Posteriormente, en 1998 se publicó la primera transferencia de embriones bovinos producidos *in vitro*, realizada con éxito al depositar los embriones en la ampulla mediante laparoscopia transvaginal (Besenfelder y Brem, 1998), y a partir de esa fecha se han realizado otros estudios semejantes, reportando resultados satisfactorios del uso de la laparoscopia vía transvaginal para la transferencia y recuperación de embriones en etapas tempranas en el oviducto (Besenfelder *et al.*, 2001; Besenfelder *et al.*, 2008; Besenfelder *et al.*, 2010). Recientemente Wetscher *et al.* (2005), mencionan que el mejor estado de desarrollo para transferir embriones en bovinos, vía laparoscópica, es blastocisto.

Otras aplicaciones

Dentro de las aplicaciones de la laparoscopia en la reproducción animal, destacan otras como la IA laparoscópica en perras, con tasas de preñez similares a la monta (65.2 vs. 65.4%, respectivamente; Silva *et al.*, 1995). Las ovariectomías han sido también una importante aplicación de la laparoscopia, sobretodo en el estudio del ciclo reproductivo y la respuesta a hormonas como los progestágenos en vacas (Bleul *et al.*, 2005), burras (Aziz *et al.*, 2008) y ovejas

(Texeira *et al.*, 2011). Existen también reportes donde se señala el uso efectivo de la laparoscopia en diagnósticos de gestación en ovejas (Phillippo *et al.*, 1971). Recientemente Gomel y Yarali (2004), publicaron resultados del tratamiento quirúrgico de ovarios poliquísticos, asociado a infertilidad en mujeres, mediante el uso de la laparoscopia, haciendo de la laparoscopia una técnica factible de aplicar en diversas especies animales.

3. LITERATURA CITADA

- Abdel-Azim, G. 2010. Effect of synchronization and semen sorting on artificial insemination bull fertility. *Journal of Dairy Science* 93: 420-425.
- Alfaris A. A., Fahid T. A., B. Ja'fer, and H. Al-Dahabi. 2012. Laparoscopic intrauterine artificial insemination and ultrasonic pregnancy diagnosis in Arabi ewes. *Journal of Evolutionary Biology* 4: 1-12.
- Ambrose, J. D., R. S. Manik, S. K. Singla, and M. L. Madan. 1993. A simplified laparoscopy technique for repeated ovarian observation in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 40: 487-496.
- Anakkul, N., J. Suwimonteerabutr, T. Tharasant, A. Khunmanee, P. Diloksumpan, D. K. Berg, and M. Techakumphu. 2014. Sperm distribution and fertilization after unilateral and bilateral laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed goat semen. *Theriogenology* 82: 1137-1144.
- Andersson, M., J. Taponen, E. Koskinen, and M. Dahlbom. 2004. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology* 61: 1583-1588.
- Aziz, D. M., M. S. Al-Badrany, and M. B. Taha. 2008. Laparoscopic ovariectomy in standing donkeys by using a new instrument. *Animal Reproduction Science* 107: 107-114.
- Babkine, M., and A. Desrochers. 2005. Laparoscopic surgery in adult cattle. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 21: 251-279.
- Baldassarre, H., D. G. de Matos, C. C. Furnus, T. E. Castro, and E. I. Cabrera F. 1994. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Animal Reproduction Science* 35: 145-150.
- Baldassarre, H., and C. N. Karatzas. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science* 82: 255-266.

- Besenfelder, U., J. Mödl, M. Müller, and G. Brem. 1997. Endoscopic embryo collection and embryo transfer into the oviduct and the uterus of pigs. *Theriogenology* 47: 1051-1060.
- Besenfelder, U., and G. Brem. 1998. Tubal transfer of bovine embryos: a simple endoscopic method reducing long-term exposure of in vitro produced embryos. *Theriogenology* 50: 739-745.
- Besenfelder, U., V. Havlicek, G. Mösslacher, and G. Brem. 2001. Collection of tubal stage bovine embryos by means of endoscopy a technique report. *Theriogenology* 55: 837-845.
- Besenfelder, U., V. Havlicek, G. Moesslacher, M. Gilles, D. Tesfaye, J. Griesse, M. Hoelker, H. P. Maddox, J. Laurincik, G. Brem, and K. Schellander. 2008. Endoscopic recovery of early preimplantation bovine embryos: effect of hormonal stimulation, embryo kinetics and repeated collection. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 566-572.
- Besenfelder, U., V. Havlicek, A. Kuzmany, and G. Brem. 2010. Endoscopic approaches to manage in vitro and in vivo embryo development: use of the bovine oviduct. *Theriogenology* 73: 768-776.
- Bernard, C., R. D. Lambert, R. Béland, and A. Bélanger. 1984. Laparoscopic investigation of the bovine ovary in the periovulatory phase of the cycle. *Theriogenology* 22: 143-150.
- Bleul, U., K. Hollenstein, and W. Kähn. 2005. Laparoscopic ovariectomy in standing cows. *Animal Reproduction Science* 90: 193-200.
- Bodmer, M., F. Janett, M. Hässing, N. den Daas, P. Reichert, and R. Thun. 2005. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 64: 1647-1655.
- Bouré, L. 2005. General principles of laparoscopy. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 21: 227-249.

- Brackett, B. G., D. Bousquet, M. L. Boice, W. J. Donawick, J. F. Evans, and M. A. Dressel. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction* 27: 147-158.
- Carter, M. L., D. J. Dierschke, and E. R. Hauser. 1981. Effect of repeated laparoscopic surgery on the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 16: 399-405.
- Carvalho, P. D., A. H. Souza, R. Sartori, K. S. Hackbart, A. R. Dresch, L. M. Vieira, P. S. Baruselli, J. N. Guenther, P. M. Fricke, R. D. Shaver, and M. C. Wiltbank. 2013. Effects of deep-horn AI on fertilization and embryo production in superovulated cows and heifers. *Theriogenology* 80: 1074-1081.
- De Graaf, S. P., G. Evans, W. M. C. Maxwell, J. A. Downing, and J. K. O'Brien. 2007. Successful low dose insemination of flow cytometrically sorted ram spermatozoa in sheep. *Reproduction in Domestic Animals* 42: 648-653.
- DeJarnette, J. M., C. R. McCleary, M. A. Leach, J. F. Moreno, R. L. Nebel, and C. E. Marshall. 2010. Effects of 2.1 and 3.5×10^6 sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *Journal of Dairy Science* 93: 4079-4085.
- DeJarnette, J. M., R. L. Nebel, C. E. Marshall, J. F. Moreno, C. R. McCleary, and R. W. Lenz. 2008. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* 91: 1778-1785.
- Dovenski, T., P. Trojancanec, V. Petkov, F. Popovska-Percinic, L. Kocoski, and J. Grizelj. 2012. Laparoscopy-promising tool for improvement of reproductive efficiency of small ruminants. *Macedonian Veterinary Review* 35: 5-11.
- Espinosa-Cervantes, R., and A. Córdova-Izquierdo. 2013. Sexing sperm of domestic animals. *Tropical Animal Health and Production* 45: 1-8.
- Fayrer-Hosken, R. A., A. I. Younis, B. G. Brackett, C. E. McBride, K. M. Harper, C. L. Keefer, and D. C. Cabaniss. 1989. Laparoscopic oviductal transfer of

- in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 32: 413-420.
- Foote, R. H. 2002. The history of artificial insemination: selected notes and notables. *Journal Animal Science* 80: 1-10.
- Frijters, A. C. J., E. Mullaart, R. M. G. Roelofs, R. P. van Hoorne, J. F. Moreno, O. Moreno, and J. S. Merton. 2009. What affects fertility of sexed semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology* 71: 64-67.
- Garner, D. L., and G. E. Seidel Jr. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69: 886-895.
- Giraldo G., J. J. 2007. Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Revista Lasallista de Investigación* 4: 51-57.
- Gomel, V., and H. Yarali. 2004. Surgical treatment of polycystic ovary syndrome associated with infertility. *Reproductive Biomedicine Online* 9: 35-42.
- Grant, V. J., and L. W. Chamley. 2007. Sex-sorted sperm and fertility: an alternative view. *Biology of Reproduction* 76: 184-188.
- Guerino M., G., M. F. Sá Filho, R. Vasconcelos S., M. Ferreira M., E. P. de Campos F., and P. Sampaio B. 2013. The use of sex-sorted sperm for reproductive programs in cattle. Success in artificial insemination-quality of semen and diagnostics employed. InTech. Rijeka, Croatia. Pp. 39-61.
- Havlicek, V., F. Wetscher, T. Huber, G. Brem, M. Mueller, and U. Besenfelder. 2005. In vivo culture of IVM/IVF embryos in bovine oviducts by transvaginal endoscopy. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine* 52: 94-98.
- Heise, A. 2012. Artificial insemination in veterinary science. A bird's-eye view of veterinary medicine. InTech. Rijeka, Croatia. Pp. 17-32.
- Hernández C., J. 2011. Noticias de reproducción bovina. Departamento de Reproducción, FMVZ, UNAM. 5: 2.

- Holland, E. J., B. M. Bindon, L. R. Piper, J. Thimonier, K. A. Cornish, and H. M. Radford. 1981. Endoscopy in cattle: techniques for ovarian examination by the paralumbar and mid-ventral routes. *Animal Reproduction Science* 4: 127-135.
- Holthausen, U. H., M. D. Manfred N., and H. Troidl. 1999. CO₂ Pneumoperitoneum: what we know and what we need to know. *World Journal of Surgery* 23: 794-800.
- Hunter, R. H. F. 2003. Advances in deep uterine insemination: a fruitful way forward to exploit new sperm technologies in cattle. *Animal Reproduction Science* 79: 157-170.
- Ishwar, A. K., and M. A. Memon. 1996. Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research* 19: 35-43.
- Kaim, M., A. Bloch, D. Wolfenson, R. Braw-Tal, M. Rosenbergm H. Voet, and Y. Folman. 2003. Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses and conception rates. *Journal of Dairy Science* 86: 2012-2021.
- Kassem, M. M., S. A. A. El-Gendy, R. E. Abdel-Wahed, and M. El-Kammar. 2011. Laparoscopic anatomy of caprine abdomen and laparoscopic liver biopsy. *Research in Veterinary Science* 90: 9-15.
- Killen, I. D., and G. J. Caffery. 1982. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Australian Veterinary Journal* 59: 95.
- Klinc, P., and D. Rath. 2007. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reproduction in Domestic Animals* 42: 63-67.
- Kurykin, J., Ü. Jaakma, L. Majas, M. Jalakas, M. Aidnik, A. Waldmann, and P. Patrik. 2003. Fixed time deep intracornual insemination of heifers at synchronized estrus. *Theriogenology* 60: 1261-1268.
- Kurykin, J., Ü. Jaakma, M. Jalakas, M. Aidnik, A. Waldmann, and L. Majas. 2007. Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different

- sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. *Theriogenology* 67:754-759.
- Lambert, R. D., C. Bernard, J. E. Rioux, R. Béland, D. D'Amours, and A. Montreuil. 1983. Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology* 20: 149-161.
- López-Gatius., F. 2000. Site of semen deposition in cattle: a review. *Theriogenology* 53: 1407-1414.
- Lousse, J. C., and J. Donnez. 2008. Laparoscopic observation of spontaneous human ovulation. *Fertility and Sterility* 90: 833-834.
- Mallory, D. A., S. L. Lock, D. C. Woods, S. E. Poock, and D. J. Patterson. 2013. Hot topic: comparison of sex-sorted and conventional semen within a fixed-time artificial insemination protocol designed for dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 96: 854-856.
- Martinez, R. D., R., L. Reyna-Santamaria, A. C. Michel-Aceves, A. A. Mastache-Lagunas, J. Hernandez-Ignacio, and S. Rojas-Maya. 2009. Cervical or intrauterine artificial insemination in Pellibuey ewes, with chilled semen. *Journal of Animal Veterinary Advances* 8: 2621-2625.
- McKelvey, W. A. C., J. J. Robinson, R. P. Aitken, and I. S. Robertson. 1986. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology* 25: 825-865.
- Meirelles, C., L. Ernandes, K., R. R. Weiss, M. Saporski, S., A. Souza, I. W. Dos Santos, and J. C. Dos Santos B. 2012. Comparison between deep intracornual artificial insemination (DIAI) and conventional artificial insemination (AI) using low concentration of spermatozoa in beef cattle. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55: 371-374.
- Mellado, M., E. Sepulveda, U. Macias-Cruz, L. Avendaño, J. E. García, F. G. Veliz, and A. Rodríguez. 2013. Effects of month of breeding on reproductive efficiency of Holstein cows and heifers inseminated with sex-

- sorted or conventional semen in a hot environment. *Tropical Animal Health and Production* 46: 265-269.
- Monnet, E., and D. C. Twedt. 2003. Laparoscopy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 33: 1147-1163.
- Morales, R., J. Hernández S., G. Rodríguez T., y R. Peña F. 2000. Comparación del porcentaje de concepción y la función lútea en vacas de primer servicio, vacas repetidoras y vaquillas Holstein. *Veterinaria México* 31: 179-184.
- Nellenschulte, E., and H. Niemann. 1992. Collection and transfer of ovine embryos by laparoscopy. *Animal Reproduction Science* 27: 293-304.
- Norman, H. D., J. L. Hutchison, and R. H. Miller. 2010. Use of sex semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holstein in the United States. *Journal of Dairy Science* 93: 3880-3890.
- Padilha, L. C., P. P. M. Teixeira, E. A. Pires-Buttler, M. Apparício, T. F. Motheo, P. A. P. Savi, E. Y. O. Nakaghi, A. E. Alves, and W. R. R. Vicente. 2014. In vitro maturation of oocytes from Santa Ines ewes subjected to consecutive sessions of follicular aspiration by laparoscopy. *Reproduction in Domestic Animals* 49: 243-248.
- Phillipo, M., G. H. Swapp, J. J. Robinson, and J. C. Gill. 1971. The diagnosis of pregnancy and estimation of foetal numbers in sheep by laparoscopy. *Journal of Reproduction and Fertility* 27: 129-132.
- Platt, D., J. L. E. Bird, and M. T. Bayliss. 1998. New information about surgery. *Equine Veterinary Journal* 30: 43-52.
- Pursley, J. R., M. C. Wiltbank, J. S. Stevenson, J. S. Ottobre, H. A. Garverick, and L. L. Anderson. 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science* 80: 295-300.
- Ragle, C. A. 2002. Laparoscopy. *Manual of Equine Gastroenterology*. Elsevier Science Limited Pp. 41-50.

- Rath, D., and L. A. Johnson. 2008. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 338-346.
- Rath, D., G. Moench-Togeder, U. Taylor, and L. A. Johnoson. 2009. Improved quality of sex-sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71: 22-29.
- Reichenbach, H. D., N. H. Wiebke, H. Wenigerkind, J. Mödl, and G. Brem. 1994. Bovine follicular oocytes collected by laparoscopic guided transvaginal aspiration. *Theriogenology* 41: 283.
- Rogel, L., and R. Tamayo. 2007. Cow mortality in three dairy herds: preliminary study (1994-2004). *Archivos de Medicina Veterinaria* 39: 255-260.
- Sá Filho, M. F., H. Ayres, R. M. Ferreira, M. Nichi, M. Fosado, E. P. Campos F., and P. S. Baruselli. 2010. Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology* 74: 1636-1642.
- Scenna, F. N., M. E. Hockett, T. M. Towns, A. M. Saxton, N. R. Rohrbach, M. E. Wehrman, and F. N. Schrick. 2005. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitors administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 78: 38-45.
- Schenk, J. L., D. G. Cran, R. W. Everett, and G. E. Seidel Jr. 2009. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology* 71: 717-728.
- Schiewe, M. C., M. Bush, L. S. Stuart, and D. E. Wildt. 1984. Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: a preliminary study. *Theriogenology* 22: 675-682.
- Scudamore, C. L., J. J. Robinson, R. P. Aitken, D. J. Kennedy, S. Ireland, and I. S. Robertson. 1991. Laparoscopy for intrauterine insemination and embryo

- recovery in superovulated ewes at a commercial embryo transfer unit. *Theriogenology* 35: 329-337.
- Seidel Jr., G. E., 2014. Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* 8: 160-164.
- Seidel Jr., G. E., and J. L. Schenk. 2008. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science* 105: 129-138.
- Seidel Jr., G. E., J. L. Schenk, L. A. Herickhoff, S. P. Doyle, Z. Brink, R. D. Green, and D. G. Cran. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52: 1407-1420.
- Senger, P. L., W. C. Becker, S. T. Davidge, J. K. Hillers, and J. J. Reeves. 1988. Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle. *Journal Animal Science* 66: 3010-3016.
- Shettko, D. L., and D. A. Hendrickson. 2008. Education and the laparoscope: uses of laparoscopy in teaching. *Journal of Equine Veterinary Science* 28: 51-53.
- Silva, L. D. M., K. Onclin, F. Snaps, and J. Verstegen. 1995. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology* 43: 615-623.
- Sohnrey, B., and W. Holtz. 2005. Technical note: transcervical deep cornual insemination of goats. *Journal Animal Science* 83: 1543-1548.
- Sorensen, E. 1946. Insemination with gelatinized sperm in paraffined cellophane tubes. *The Veterinary Journal* 102: 235-237.
- Tapia, D., G. Dueñas, A. Gallegos, J. Sarria, and E. Mellisho. 2011. Inseminación laparoscópica con semen congelado en cabras criollas de Cañete-Lima. *Spermova* 1: 129-130.
- Tervit, H. R. 1996. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Animal Reproduction Science* 42: 227-238.

- Texeira, P. P. M., L. C. Padilha, M. E. F. Oliveira, T. F. Motheo, A. S. L. da Silva, F. F. P. C. Barros, L. N. Coutinho, F. N. Flores, M. C. S. Lopes, M. B. Bandarra, M. A. M. Silva, R. O. Vasconcelos, L. F. S. Rodrigues, and W. R. R. Vicente. 2011. Laparoscopic ovum collection in sheep: gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Animal Reproduction Science* 127: 169-175.
- Vazquez, J. M., I. Parrilla, M. A. Gil, C. Cuello, I. Caballero, J. L. Vazquez, J. Roca, and E. A. Martínez. 2008. Improving the efficiency of insemination with sex-sorted spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 1-8.
- Vilos, G. A., A. Ternamian, J. Dempster, and P. Y. Laberge. 2007. Laparoscopic entry: a review of techniques, technologies, and complications. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 29: 433-447.
- Wetscher, F., V. Havlicek, T. Huber, M. Gilles, D. Tesfaye, J. Griesse, K. Wimmers, K. Schellander, M. Müller, G. Brem, and U. Besenfelder. 2005. Intrafallopian transfer of gametes and early stage embryos for in vivo culture in cattle. *Theriogenology* 64: 30-40.
- Williams, B. L., P. L. Senger, and J. L. Oberg. 1987. Influence of cornual insemination on endometrial damage and microbial flora in the bovine uterus. *Journal Animal Science* 65: 212-216.

4. A New Device to Inseminate Cows at the Base of the Uterine Horns

O García-Peña¹, R Rangel-Santos¹, R Rodríguez-De Lara¹, CA Apodaca-Sarabia¹ and EJ Maldonado-Simán¹

¹Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, México

4.1 Content

A new device (Chapingo device) to deposit semen at the base of the uterine horns of cattle was developed at Universidad Autonoma Chapingo, Mexico. Nine Holstein heifers were inseminated by transvaginal laparoscopy, using a laparoscope for cattle and the Chapingo device. A dose of sexed semen (2.1×10^6 spermatozoa) was deposited at the base of the uterine horn ipsilateral to the ovary where the preovulatory follicle was identified. Insemination was achieved in all the heifers, taking on average 13.7 ± 3.1 min per animal. In all cases, it was possible to see both ovaries, the base of the uterine horns and the oviducts. After the procedure, none of the heifers showed any type of complications such as hemorrhage, adhesions or trauma. On days 21 and 22 after insemination, four of the nine heifers (44.4%) returned into estrus; on day 30 after insemination, one heifer was found to be pregnant by ultrasound. The results show the feasibility of generating pregnancies by transvaginal laparoscopy in heifers inseminated with sexed semen.

4.2 Introduction

Artificial insemination (AI) is one of the main reproductive biotechnologies applied to achieve genetic and reproductive improvement in dairy cattle (Vishwanath 2003). However, the pregnancy rate using AI is lower than with natural mating (Lima et al. 2009). With the aim of increasing the efficiency of AI, in the last few years, some biotechnologies such as estrus synchronization and the cryopreservation and sexing of semen have been developed (Foote 2002).

The increasing demand for heifers for replacement, together with the constant increase in their price and the persistence of sanitary problems that limits the importation of replacements from other countries have all led to an increase in the use of sexed semen (SS) for AI (De Vries et al. 2008). It is estimated that annually in the United States of

America, near to two million dosages of SS are commercialized, which represents almost 5% of the total bovine semen being sold (Seidel 2014). In dairy cattle, the use of SS has been limited to heifers at the first and second service (DeJarnette et al. 2009), since the pregnancy rate is higher in heifers than in cows (46 vs. 27%) when inseminated with SS (DeJarnette et al. 2008). Furthermore, some strategies have been developed to increase the pregnancy rate when using SS. These include an increase in the number of services (Sá Filho et al. 2010) or spermatozoa per dose (DeJarnette et al. 2008), as well as modifications in the procedures and protocols used for sexing semen (Rath et al. 2009). On the other hand, it has been demonstrated that the location of SS application affects the conception rate, as it is higher when the semen is deposited close to the middle part of the uterine horn (Kurykin et al. 2007).

Laparoscopy has been used successfully in the reproductive management of small ruminants, mainly in AI where pregnancy rates from 60 to 75% have been reported (Martinez et al. 2009; Dovenski et al. 2012; Anakkul et al. 2014). Although there are some reports in which laparoscopy has been used to monitor the reproductive tract in cattle (Babkine and Desrochers 2005), information regarding its use in AI is scarce. Recently, there have been some reports on the use of transvaginal laparoscopy for embryo recovery in cattle (Besenfelder et al. 2008), suggesting the possibility of using such a procedure to perform AI. The objective of this study was to develop a device to inseminate heifers by transvaginal laparoscopy (TL) using SS.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Animals, housing and management

The study was conducted in the Animal Reproduction Laboratory and the dairy farm of the Animal Science Faculty of Universidad Autonoma Chapingo, Mexico (N latitude 19° 29'05'' and longitude W 98° 53'11'') (CONAGUA 2016).

Nine Holstein heifers from one to two years of age and weighing 350 to 400 kg body weight were used. The heifers were located in corrals with individual beds and shade, and they were fed a mixture of corn silage and alfalfa hay (60 and 40% of the dry matter, respectively) and water *ad libitum*. The animals were handled following the criteria approved by the Canadian Council on Animal Care (2009).

4.3.2 Development of the Chapingo device

A device was designed and built to place semen (Chapingo device) at the base of the uterine horn by transvaginal laparoscopy. The device was composed of two sections of plastic tubing (PT), both with an external diameter of 0.47 cm and internal diameter of 0.28 cm, and a length of 8 cm (Fig. 1.b) and 53 cm (Fig. 2.a); a section of 5 cm long metal tubing with external and internal diameters of 0.25 and 0.20 cm, respectively (Fig. 1.a); a metal piece with a round tip (RT), 1 cm long, with an internal diameter of 0.20 cm and external diameter of 0.35 (first half) and 0.28 cm (second half; Fig. 1.c); a curve metal 21 G needle, 1.5 cm long (Fig. 1.d); a stainless steel wire 70 cm long and 0.15 cm in diameter (Fig. 2.b).

In the first half of the RT, the 21 G needle was mounted; the second half of the RT was placed in one of the extremes of the shortest section of the PT, while the metal tube was placed in the other extreme. The metal tube allowed for disconnecting the largest section of the PT at the time of placing and removing the straw (0.25 mL). The straw was placed into the shortest section of the PT. Finally, the stainless steel wire was used as a plunger to push the semen from the straw. The length of the needle was determined according to the thickness of the uterine wall at the base of the uterine horn, which was measured using cow uterus obtained from a slaughterhouse, in such a way that the tip of the needle was placed in the lumen of the uterine horn.

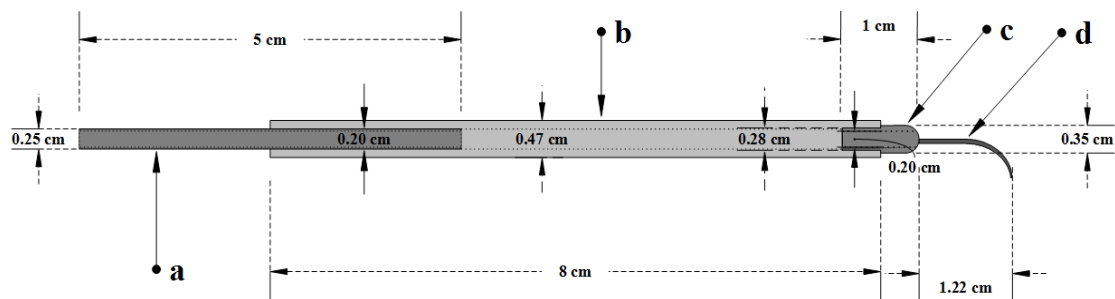


Fig. 1. Components of the anterior section of the Chapingo device.

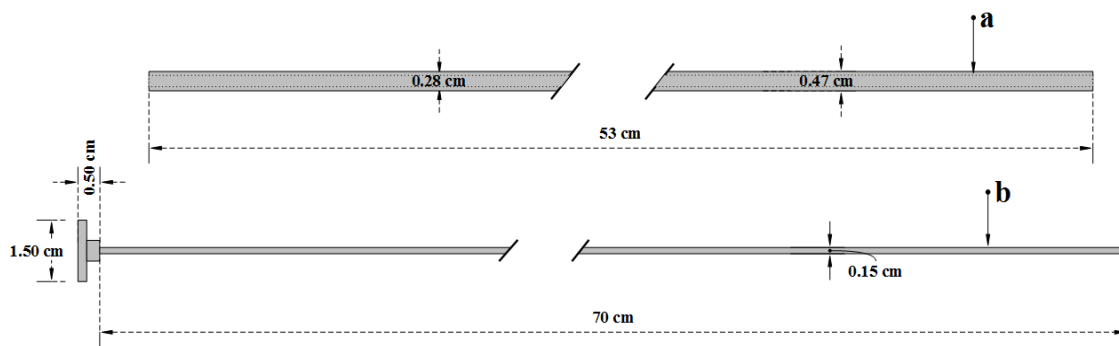


Fig. 2. Components of the posterior section of the Chapingo device.

4.3.3 Estrus synchronization and estrus detection

Estrus synchronization was carried out through the application of 1.9 g of progesterone using an intravaginal device (CIDR®, Pfizer, New Zealand) and 200 µg of gonadorelin (GnRH®, Sanfer, Mexico) on day 0 of the protocol. On day 7 of the protocol, 500 µg of cloprostenol (Celosil®, Intervet, Mexico) were administered after CIDR removal. The status of the reproductive tract was determined before the synchronization protocol was started and before CIDR withdrawal, just before AI, with an ultrasound (Aloka SSD 500, Japan) equipped with a 5.0 MHz linear probe. Estrus detection started 12 h after CIDR withdrawal, considering a heifer to be in estrus when she permitted mating. Twelve hours after estrus detection, the animals were inseminated by TL.

4.3.4 Artificial insemination procedure by transvaginal laparoscopy

Cattle laparoscopy equipment was used (Fig. 3; Karl Storz-Endoscope, Germany), which was composed of a universal cannula, round and pyramidal tip plungers, a two-way working channel and a 30° angle laparoscope. All the instruments were plunged in a solution of water and disinfectant (0.5 gr/L of Timsen®, United Chemical Corp. & United Promotions Inc., USA) before laparoscopy started. The animal was placed in a handling facility in the standing position and was secured. Then, the animal received xylazine (Xylazine®, Specialty Veterinary Pharmacy, USA), 0.05 mg/kg body weight IM, and subsequently 60 mg lidocaine hydrochloride (Pisacaina®, Pisa Agropecuaria, Mexico) as epidural anesthesia. The feces were removed manually. The perianal region was washed with soap and water, and disinfected with 70% alcohol.

After the sensitivity of the perianal region was lost, the universal cannula and the round tip plunger were introduced through the vagina, both placed in the medial dorsal part of the vagina by applying constant pressure to distend the tissue and facilitate going through the vaginal wall. The round tip plunger was replaced by the pyramidal tip plunger and the vaginal wall was punctured; immediately, the pyramidal tip plunger was removed, while the universal cannula was introduced in the pelvic cavity. The laparoscope, connected through an optic cable fiber to a 250-watt light source (Karl Storz endoscope, Germany), was placed in the main working channel, and both were introduced into the universal cannula. Initially, a general visual exploration of the reproductive tract was performed and some air was insufflated with the help of an air compressor (Oakland High Power, Mexico) to make more space and to see inside properly.

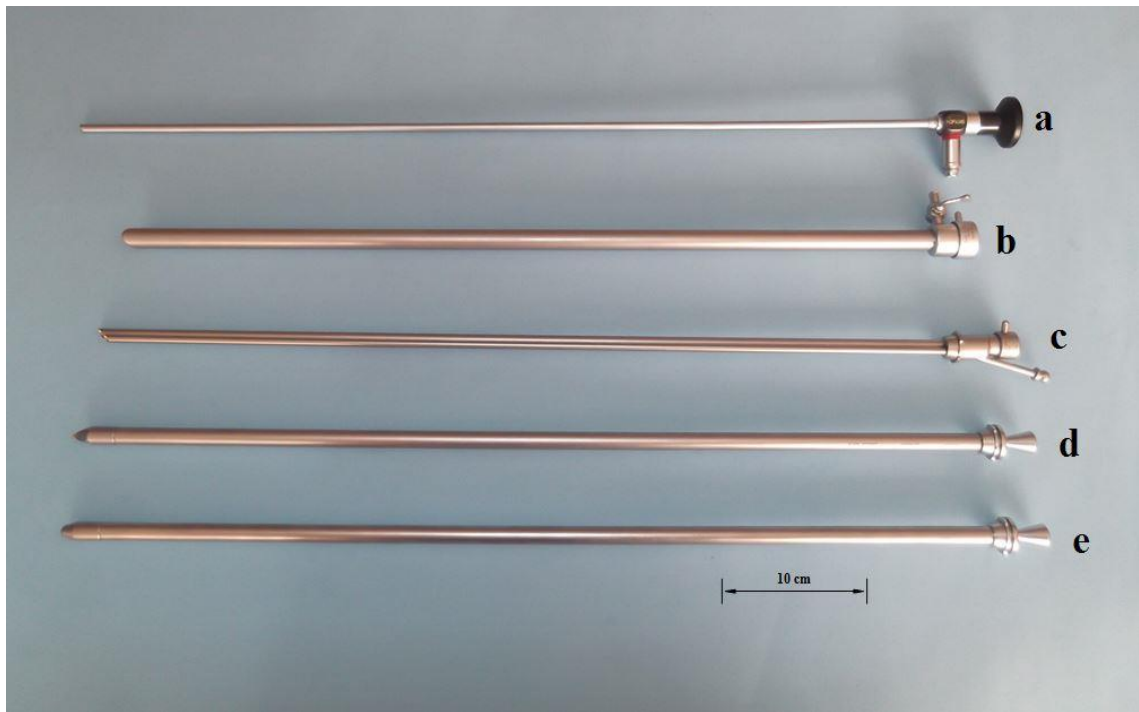


Fig. 3. Laparoscopy instruments: a) laparoscope, b) universal cannula, c) working channel, d) pyramidal tip plunger, and e) round tip plunger.

After the uterine horns were located, we proceed to prepare the device to perform the AI. The straw was thawed at 37°C for 45 seconds, and semen viability was confirmed with the help of a microscope. The straw was placed in the Chapingo device, which was placed in the area of the instruments at the working channel and introduced in the pelvic cavity through the universal cannula. Within the pelvic cavity, the needle of the insemination

device was directed down and the laparoscopic instruments were placed at about 30° to the dorsal part of the base of the uterine horns (Fig. 4). The needle was introduced carefully and the semen was placed at the base of the uterine horn ipsilateral to the ovary where the preovulatory follicle was identified.

After semen application, the instruments were withdrawn from the animal and the heifer received IM 2 million IU penicillin G procaine and G benzathine, as well as 4 g dihydrostreptomycin (Shotapen L.A.®, Virbac, Mexico). The progress of the animals was monitored for 7 days after laparoscopy.

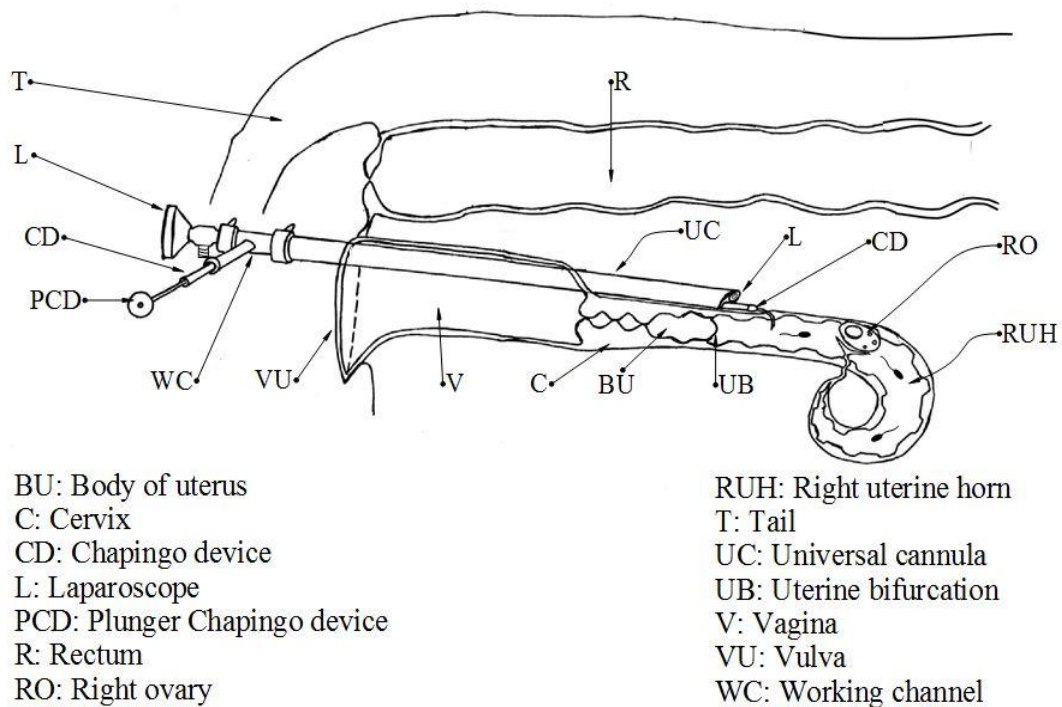


Fig. 4. Position of the laparoscopy instruments at the time of semen application at the base of the uterine horn.

4.3.5 Diagnosis of pregnancy

The return to estrus was recorded 21 ± 2 d after insemination, and 30 days after AI, pregnancy assessment was performed by ultrasound (Aloka Prosound, Japan) equipped with a 5 MHz linear probe. The heifer was considered pregnant when a fetus was visible on the screen.

4.4 Results

The AI procedure by transvaginal laparoscopy was accomplished in nine heifers, requiring 13.7 ± 3.1 min per animal. In all the heifers, it was possible to see both ovaries, the base of the uterine horns and the oviducts. In one of the heifers, it was possible to see fluid around the uterine horns, which complicated proper visualization during the AI procedure; nevertheless, it was possible to place the semen at the base of the uterine horn. In three of the nine heifers (33%), it was not necessary to insufflate air, as the visualization was sufficient to complete the artificial insemination procedure. In the heifers in which air was insufflated, there was an improvement in visualization. In three of the cases, there was foam around the uterine horns and ovaries, which compromised visualization when the laparoscope was closer because the foam covered the lens of the laparoscope. This increased the time required for insemination (16.7 min on average). Three of the heifers in which the time required for insemination was increased were more nervous and restless than the other animals, and this situation complicated the AI. None of the heifers showed any type of complications such as hemorrhage, adhesions or trauma after the laparoscopy. On days 21 to 23 after insemination, four of the nine (44.4%) heifers returned to estrus. Finally, by ultrasound, one of the heifers was found to be pregnant (Fig. 5).



Fig. 5. Pregnancy of 30 days obtained by transvaginal laparoscopic insemination.

4.5 Discussion

In this study, laparoscopic transvaginal AI allowed the establishment of a pregnancy. The procedure was technically simple and there were no complications or trauma recorded during or after it. To our knowledge, there is no information regarding the use of TL for AI in heifers, although there is information on its use for embryo recovery and transfer in cattle (Havlicek et al. 2005; Besenfelder et al. 2008), where the technique was used with satisfactory results. In the present study, the application of semen at the base of the uterine horn was successful, and the pregnancy results suggest that TL could be a viable alternative method of performing AI in heifers using SS. However, it is necessary to adjust the technique to achieve higher pregnancy rates. It is important to mention that TL presents multiple advantages compared to conventional AI, such as the ability to view several structures of the reproductive tract such as the uterine horns, oviducts and ovaries, which increases the potential applications of this technique.

4.5.1 Acknowledgements

The authors thank the Animal Reproduction Laboratory and the dairy farm of the Animal Science Faculty of Universidad Autonoma Chapingo, as well as Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) for their support for the present study.

4.5.2 Conflicts of interest

None of the authors have any conflicts of interest to declare.

4.5.3 Contribution of the authors

Oswaldo García-Peña was involved in the design and performance of the study and writing of the document. Raymundo Rangel-Santos was involved in the design, performance and supervision of the study, and review of the document. Raymundo Rodríguez-De Lara, Carlos Antonio Apodaca-Sarabia and Ema de Jesús Maldonado-Simán were involved in the review of the document and supervision of the study.

4.6 References

Anakkul N, Suwimonteerabutr J, Tharasanit T, Khunmanee S, Diloksumpan P, Berg DK, Techakumphu M, 2014: Sperm distribution and fertilization after unilateral and bilateral

laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed goat semen. *Theriogenology* **82**, 1137-1144.

Babkine M, Desrochers A, 2005: Laparoscopic surgery in adult cattle. *Vet Clin Food Anim* **21**, 251-279.

Besenfelder U, Havlicek V, Moessler G, Gilles M, Tesfaye D, Griesse J, Hoelker M, Maddox Hyttel P, Brem G, Schellander K, 2008: Endoscopic recovery of early preimplantation bovine embryos: effect of hormonal stimulation, embryo kinetics and repeated collection. *Reprod Dom Anim* **43**, 566-572.

Canadian Council on Animal Care, 2009: CCAC guidelines on: the care and use of farm animals in research, teaching and testing. Canada. http://www.ccac.ca/en/_standards/guidelines (accessed April 29, 2016).

CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. Servicio Meteorológico Nacional. 2016. Normales Climatológicas por Estación. México. Chapingo. http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=42&Itemid=75 (accessed April 28, 2016).

DeJarnette JM, Nebel RL, Marshall CE, Moreno JF, McCleary CR, Lenz RW, 2008: Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* **91**, 1778-1785.

DeJarnette JM, Nebel RL, Marshall CE, 2009: Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* **71**, 49-58.

De Vries A, Overton M, Fetrow J, Leslle K, Elcker S, Rogers G, 2008: Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *J Dairy Sci* **91**, 847-856.

Dovenski T, Trojancanec P, Petkov V, Popovska-Percinic F, Kocoski L, Grizelj J, 2012: Laparoscopy-promising tool for improvement of reproductive efficiency of small ruminants. *Mac Vet Rev* **35**, 5-11.

Foot RH, 2002: The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci* **80**, 1-10.

Havlicek V, Wetscher F, Huber T, Brem G, Mueller M, Besenfelder U, 2005: In vivo culture of IVM/IVF embryos in bovine oviducts by transvaginal endoscopy. *J Vet Med* **52**, 94-98.

Kurykin J, Jaakma Ü, Jalakas M, Aidnik M, Waldmann A, Majas L, 2007: Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. *Theriogenology* **67**, 754-759.

Lima FS, Risco CA, Thatcher MJ, Benzaquen ME, Archbald LF, Santos JEP, Thatcher WW, 2009: Comparison of reproductive performance in lactating dairy cows bred by natural service or timed artificial insemination. *J Dairy Sci* **92**, 5456-5466.

Martinez RRD, Reyna-Santamaria L, Michel-Aceves AC, Mastache-Lagunas AA, Hernandez-Ignacio J, Rojas-Maya S, 2009: Cervical or intrauterine artificial insemination in Pelibuey ewes, with chilled semen. *J Anim Vet Adv* **8**, 2621-2625.

Rath D, Moench-Tegder G, Taylor U, Johnson LA, 2009: Improved quality of sex-sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* **71**, 22-29.

Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Nichi M, Fosado M, Campos Filho EP, Baruselli PS, 2010: Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology* **74**, 1636-1642.

Seidel GE, 2014: Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* **8**, 160-164.

Vishwanath R, 2003: Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* **59**, 571-584.