

**PASANTÍA EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS DEL POLITÉCNICO COLOMBIANO JAIME
ISAZA CADAVID**

INFORME FINAL

GERARDO ANTONIO MALDONADO CASTRO

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TUNJA

2018

**PASANTÍA EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS DEL POLITÉCNICO COLOMBIANO JAIME
ISAZA CADAVID**

PRESENTADA POR:

GERARDO ANTONIO MALDONADO CASTRO

Código: 201021916

**Como requisito parcial para obtener el título como Médico Veterinario
Zootecnista**

TUTOR EXTERNO: JORGE GOMEZ OQUENDO, MV.

TUTOR INTERNO: JOSE LUIS PORRAS VARGAS, MVZ, Esp, Msc

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TUNJA

2018

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	
1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENTIDAD	3
1.2 POLITÉCNICO COLOMBIANO JAIME ISAZA CADAVID.	3
1.2.1 FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS.	3
1.1.2. LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL.	4
1.1.2.1. Equipos con los que cuenta el laboratorio	6
2. ACTIVIDADES DESARROLLADAS	11
2.1 LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA	12
2.1.1. FERTILIZACIÓN IN VITRO.	13
2.1.1.1. Recolección de oocitos.	14
2.1.1.2. Selección y clasificación.	17
2.1.1.3. Maduración de oocitos.	21
2.1.1.4. Fertilización y obtención de embriones	23
2.1.1.5. Criopreservación.	32
2.1.1.6. Sincronización de receptoras.	38
2.2 ANDROLOGÍA	40
2.2.1 CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN BOVINO.	40
2.2.1.1. Colecta.	41
2.2.1.1.1 Evaluación de órganos externos	41
2.2.1.1.2. Evaluación de órganos internos	44
2.2.1.2. Recolección de semen	45
2.2.1.3. Evaluación de semen.	48
2.2.1.3.1. Evaluación macroscópica.	49
2.2.1.3.2. Densidad macroscópica.	50
2.2.1.4 Dilución y congelación de semen.	58
3. DISCUSIÓN DE CASO. PROCESO DE FERTILIZACIÓN IN VITRO, FINCA EL LIMONAR	60
3.1. UBICACIÓN.	60
3.2. SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS.	60
3.3. ASPIRACIÓN FOLICULAR.	61
3.4. PROCESO DE MADURACIÓN	64
3.5. FERTILIZACIÓN Y CLIVAJE EMBRIONARIA	65
3.6. EMBRIONES TRANSFERIDOS A RECEPTORAS.	65
4. CONCLUSIONES	68
5.RECOMENDACIONES	69
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	

LISTADO DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Actividades desarrolladas durante el tiempo de pasantía en el laboratorio de biotecnología animal del Politécnico Jaime Isaza Cadavid.	12
Tabla 2. Aspiraciones foliculares durante la pasantía.	16
Tabla 3. Clasificación de los Oocitos de acuerdo a la apariencia de las células del cúmulus	19
Tabla 4. Clasificación de los Oocitos de acuerdo a la apariencia del ovoplasma.	19
Tabla 5. Evaluación de embriones por día	31
Tabla 6. Protocolo de sincronización de receptoras	38
Tabla 7. Promedio de la circunferencia escrotal en toros de acuerdo a los rangos de edad.	42
Tabla 8: Relación entre el color del semen recolectado y su concentración en número de espermatozoides por milímetros cubico	48
Tabla 9. Densidad macroscópica con base en el número de espermatozoides por mililitro	50
Tabla 10. Clasificación de la motilidad individual en eyaculados bovinos	51
Tabla 11. Receptoras valoradas por palpación rectal.	60
Tabla 12 Aspiración folicular, selección y clasificación de oocitos finca El Limonar.	61
Tabla 13. Proceso de maduración de oocitos, finca El Limonar	63

Tabla 14. Clivaje de Embriones, Finca El Limonar	64
Tabla 15. Transferencia de embriones Finca El Limonar.	65
Tabla 16. Vacas confirmadas de 90 días transferencia de embriones.	66

LISTADO DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Micro manipulador.	6
Figura 2: Cámara de flujo y estéreo microscopio.	7
Figura 3. Incubadoras Thermo Scientific.	7
Figura 4. Laboratorio móvil.	8
Figura 5. Sistema CASA.	9
Figura 6. Marcadora de pajillas.	9
Figura 7. Empacadora-selladora de pajillas.	10
Figura 8. Punción ovarios de matadero	15
Figura 9. Colocación del ovario para la punción folicular	16
Figura 10. Elementos para la selección y clasificación	18
Figura 11. oocitos con diferente clasificación	20
Figura 12. Soporte de vitrificación	35
Figura 13. Vitrificación	35
Figura 14. Laboratorio andrología	40
Figura 15. Colecta por vagina artificial	44
Figura 16. Vagina artificial para bovinos	45
Figura 17. Electroeyaculador	46
Figura 18. Tinción eosina- nigrosina	52
Figura 19. Vitalidad espermática	53
Figura 20. Espectrofotómetro	54
Figura 21. Cámara de Neubauer	54
Figura 22. Conteo cámara de neubauer	55

Figura 23. Proceso de aspiración folicular en las Donadoras.	61
Figura 24. Clasificación de embriones obtenidos en la Finca el Limonar.	62
Figura 25. Selección y clasificación de oocitos	63

INTRODUCCIÓN

El sector pecuario es uno de los sectores de mayor crecimiento, llegando a representar el 40% de la producción agrícola mundial; esto se debe a que como renglón primario de la producción se ofrecen a los consumidores y a la agroindustria materias primas alimenticias como carne, leche, pieles, huevo, entre otros productos principales y secundarios. Sin embargo, en varios países la producción pecuaria se ha convertido en una actividad de diferentes enfoques, la cual cubre necesidades de mejora en la seguridad alimentaria, ofreciendo no solo productos en cantidad sino en calidad, siendo esto último para muchos consumidores lo más importante; y además a lo anterior, cada vez se tiene más conciencia del cómo se produce, para lo cual y en conjunto a los demás procesos, se tiene en cuenta que los sistemas de producción sean sustentables, tanto en términos económicos como en términos ecológicos (FAO 2012).

Ya desde el punto de vista productivo y con el firme propósito de mejorar la sustentabilidad de los sistemas de producción pecuaria, se han profundizado en el estudio y/o investigación de procesos productivos y reproductivos; y en lo que respecta a este último, cada vez se avanza más en las investigaciones sobre las técnicas de biotecnología reproductiva, las cuales son siempre puestas al servicio de la comunidad: ganadera, gremio equino, productores de pequeñas especies, fauna silvestre (para conservación de especies y técnicas de reproducción asistida), procesos reproductivos en animales de compañía.

Todas las técnicas de biotecnología reproductiva que comprenden los procesos tales como: inseminación artificial, criopreservación de semen, sexado de espermatozoides, súper ovulación, transferencia de embriones, fertilización in vitro (FIV) y clonación, son usadas para mejorar la eficiencia reproductiva y

hacer que los sistemas de producción sean competitivos y eficientes productivamente; más teniendo en cuenta que estos procesos son usados como herramientas para el mejoramiento genético de los animales. De modo particular, en Colombia, la Transferencia de embriones (TE) se ha utilizado como herramienta de mejoramiento durante los últimos 20 años, y desde hace 10 se inició la producción comercial a través de técnicas in vitro; esta herramienta ha permitido que Colombia se posicione como productor de ganado élite, especialmente de la raza Brahman. En la actualidad esta reproducción confirma que la TE con embriones FIV avanza a un ritmo acelerado, mientras la TE convencional está en declive por lo que en el futuro cercano la FIV se puede convertir en la técnica preferida por los ganaderos para sus programas de mejoramiento genético (Oyuela y Jimenez 2010).

Basados en lo anteriormente señalado, el Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid de la Ciudad de Medellín (Antioquia) ha puesto al servicio de toda la comunidad académica, investigativa y productiva el **“Laboratorio de biotecnología animal”** el cual ofrece servicios de andrología y embriología, en los que se llevan procesos de colecta, evaluación y criopreservación de semen, y técnicas de Fertilización in vitro; dicho laboratorio tiene injerencia no solo a nivel regional sino Nacional. Por lo tanto, la realización de la pasantía en esta entidad permitió conocer, aprender y tomar destreza en los procesos de biotecnología reproductiva que se llevan a cabo en este lugar, constituyéndolo entonces en un excelente lugar de práctica.

1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENTIDAD

1.2. POLITÉCNICO COLOMBIANO JAIME ISAZA CADAVID.

El Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid es una Institución universitaria de carácter público, adscrita al Gobierno Departamental de Antioquia y fundada en marzo de 1964. Ofrece educación superior en los niveles técnico, tecnológico y universitario mediante una oferta de programas académicos de pregrado y posgrado en distintas áreas de la ingeniería, la administración, las ciencias agrarias, la comunicación audiovisual, el deporte y la recreación. Su oferta académica incluye cursos de educación continuada y educación no formal. Adicionalmente, el Politécnico Colombiano ofrece servicios para el sector empresarial y para la comunidad a través de programas y grupos especiales de asesoría e investigación. A lo largo de sus más de 50 años de historia, el Politécnico Colombiano se ha destacado por ser el más importante centro de educación tecnológica del país (Politécnico Colombiano Página Web, 2017).

1.2.1 FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS. En cuanto a su misión, de la Facultad de Ciencias Agrarias se orienta hacia una vocacionalidad tecnológica y con su talento humano, ofrece una educación integral con programas de calidad de pregrado y posgrado, apoyados en la gestión del conocimiento de base científica, promoviendo acciones innovadoras, desde la docencia, la investigación y la proyección social, para contribuir al desarrollo económico, social y ambiental en el sector agropecuario de Antioquia y Colombia (Consejo de Facultad, Acta 01 del 28 de enero de 2011) (Politécnico Colombiano Página Web, 2017).

En su objetivo se destaca el formar una comunidad de profesionales en las Ciencias Agrarias, destacados por su calidad académica, investigativa y humana; es una facultad comprometida con la formación de ciudadanos líderes

en la generación e innovación de tecnologías y procesos sostenibles en el campo agrario, apoyándose en procesos académicos flexibles, dinámicos e integrales.

Las carreras ofrecidas por la Facultad son: Ingeniería agropecuaria (Registro SNIES 5243, Duración 10 semestres) y administración de empresas agropecuarias (Registro SNIES 4206, Duración 10 semestres), tecnología agropecuaria (Registro SNIES 2859, duración 6 semestres), y una Maestría en Gestión de la producción animal (Registro SNIES 91323, Duración 4 semestres). Contando todos sus programas con registros calificados vigentes y acreditación de alta calidad.

1.1.2. LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL. El centro de Laboratorios y Experimentación es una dependencia adscrita a la Vicerrectoría de Docencia e Investigación, que dentro de sus funciones esta la administración de los laboratorios ubicados en la Sedes Poblado, Bello y Niquía. Adscrito a esta central, se encuentra el **laboratorio de biotecnología animal** en el municipio de Bello en la carrera 58 # 27B - 125 específicamente en el barrio Las Cabañas, en un sector de amplio desarrollo comercial y residencial, con excelente servicio de transporte que facilita el acceso desde la Estación Madera del Metro a cerca de 1125 estudiantes semanalmente de las diferentes facultades (Politécnico Colombiano Página Web, 2017). El laboratorio de biotecnología animal, al igual que el resto de laboratorios del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, cuenta con la infraestructura física requerida, logrando que cada semestre se desarrollen las actividades práctico-experimentales, que soportan las distintas asignaturas y que dan un importante apoyo a la Investigación.

El Laboratorio de biotecnología animal se encuentra adscrito al **Grupo de Investigación GIBA (Grupo de biotecnología animal)** categorizado en la convocatoria de medición de grupos de Colciencias en “categoría A” y cuyo director es actualmente el Docente Jorge Enrique Gómez Oquendo; las labores

investigativas son apoyadas por el trabajo realizado por los Semilleros de Investigación en biotecnología animal, y a este grupo pertenecen docentes vinculados, docentes de otras instituciones, docentes de cátedra y estudiantes.

En lo que respecta a la normatividad del laboratorio para su funcionamiento, se cuenta con certificación ICA otorgadas al laboratorio de biotecnología animal como unidad de procesamiento para semen y embriones y al laboratorio móvil de genética y reproducción como unidad de recolección (Resolución ICA 13958 del 11 de octubre de 2016). Por cuestiones de operatividad el laboratorio está dividido en dos secciones; **laboratorio de embriología y laboratorio de andrología**, donde se prestan servicios de Docencia, Investigación y Extensión o servicio comercial. A nivel de Docencia, este laboratorio apoya las áreas de reproducción y biotecnología reproductiva; con respecto al área de investigación, en el laboratorio se realizan estudios a nivel de pregrado y posgrado (tesis de maestría y Doctorado). Finalmente, en el área de extensión se ofrecen los servicios del laboratorio a la comunidad en general; ganaderos, gremio equino y eventualmente se realizan procedimiento en caninos y porcinos.

En el área de embriología, se prestan servicios de: Manejo de oocitos para Fertilización In Vitro, donde se incluyen los procesos de búsqueda, clasificación, maduración, fertilización, vitrificación y congelación de embriones; adicional a lo anterior, los profesionales adscritos realizan procesos en campo como: sincronización de receptoras, aspiración folicular, palpación y capacitaciones a estudiantes en temáticas que tiene que ver con procesos reproductivos. En lo que respecta al área de andrología se prestan los servicios de: colecta de semen y evaluación de calidad seminal donde incluyen aspectos como; movilidad y concentración espermática, el cual se realiza por medio del sistema CASA, se realizan procesos de HOST (prueba hiposmotica), tinción espermática con eosina-nigrosina para evaluación de morfología; pruebas de viabilidad y criopreservación.

Para los servicios prestados en campo, el Politécnico Jaime Isaza Cadavid cuenta con un laboratorio móvil siendo este el primer laboratorio móvil de biotecnología registrado ante el ICA, el cual está equipado con todo lo

necesario para prestar un excelente servicio en áreas de andrología (colecta y evaluación de semen), como en embriología (búsqueda de oocitos).

1.1.2.1. Equipos con los que cuenta el laboratorio: Como ya se mencionó, en el **área de embriología** se prestan servicios de Fertilización in vitro (selección y maduración de óvulos, cultivo, Feeding y congelación) y adicionalmente Vitrificación y microscopio de fluorescencia. Para esta área el laboratorio cuenta con un Micromanipulador, cámara de flujo laminar, estereoscopio; estos como equipos principales.

- **Micro manipulador.** El laboratorio cuenta con un (1) micro manipulador (Figura 1) marca eppendorf y un microscopio marca zeiss en el que se realizan los procedimientos de ICSI (Inyección intracitoplasmática); la cual es una técnica de reproducción asistida incluida en el tratamiento de Fertilización In Vitro (FIV), donde se extraen y seleccionan los mejores espermatozoides que serán utilizados para la fecundación de los oocitos.



Figura 1. Micro manipulador. Fuente: Autor

- **Cámara de flujo laminar y estereoscopio.** En la cámara de flujo laminar marca ESCO se realizan todos los procedimientos de manipulación del material genético, esto debido a que las cámaras permiten un ambiente estéril para la realización de todos los procedimientos. Adicionalmente, se cuenta con un estereoscopio marca NIKON, y es en este donde se realiza el trabajo de búsqueda, selección y en general, los procesos de manipulación de espermatozoides, oocitos y embriones (Figura 2).



Figura 2: Cámara de flujo y estéreo microscopio. Fuente, Autor

- **Incubadoras.** El laboratorio maneja dos (2) incubadoras marca Thermo Scientific, una para los procedimientos de investigación y otra con uso exclusivo para procedimiento de servicios comerciales (Figura 3).



Figura 3. Incubadoras Thermo Scientific. Fuente, Autor

- **Laboratorio móvil.** El laboratorio móvil de reproducción, se encuentra equipado con lo necesario para prestar los servicios de embriología y andrología a nivel de campo. Además, es el único laboratorio móvil que cuenta con certificación ICA, lo que permite garantizar un servicio de calidad.



Figura 4. Laboratorio móvil. Fuente: Autor.

En lo que respecta al **área de andrología** se prestan servicios de colecta y evaluación seminal (concentración, movilidad, Host, morfología y viabilidad) y congelación, y los equipos con los que se cuentan son los siguientes:

- **Sistema CASA.** Para los procedimientos de andrología se usa el *computer Assisted Semen Análisis (CASA)*, el cual evalúa la concentración y movilidad espermática. Este sistema fue desarrollado en la universidad de Pensilvania por Liu y Warne en 1977 y perfeccionado por Amann y Hammeratedt en 1980, el análisis de semen asistido por computador (CASA) ha permitido una medición objetiva de muchos parámetros de la movilidad y la morfología de semen, ofreciendo mediciones más confiables, imparciales y repetibles, respecto al examen visual (Colenbrander et al. 2003; Graham & Mocé, 2005).

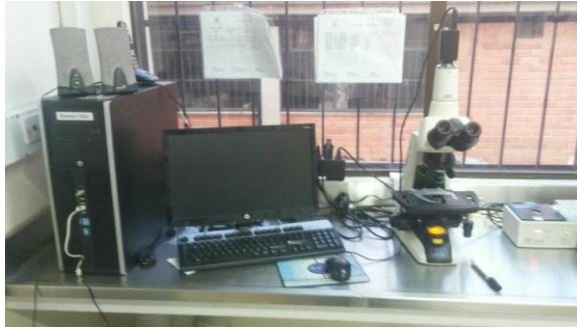


Figura 5. Sistema CASA. FUENTE: Autor

- **Marcadora.** La marcadora con la que cuenta fue fabricada de forma artesanal, la cual presta un servicio del marcaje de pajillas, el laboratorio cuenta con una (1), y se presta el servicio de marcaje a la comunidad en general (Figura 6).



Figura 6. Máquina marcadora de pajillas. Fuente: Autor

- **Empacadora-Selladora de pajillas.** El laboratorio posee una (1) empacadora y selladora de pajilla, para servicios académicos y de extensión. Trabaja con pajilla de 0,5 ml y 0,25 ml, permitiendo un trabajo continuo y ágil.



Figura 7. Empacadora-selladora de pajillas. Fuente: Autor

Adicionalmente cada laboratorio cuenta para su funcionamiento con: Equipo de baño María, balanzas analíticas, microscopios, nevera y congelador y con áreas de vestier y lavado de manos.

2. ACTIVIDADES DESARROLLADAS

Es importante señalar que las técnicas de biotecnología aplicadas a la reproducción animal han cobrado gran importancia en las actividades pecuarias; estos procesos incluyen técnicas como la inseminación artificial y conservación de semen, las cuales fueron las primeras herramientas usadas en los programas de mejoramiento genético; sexado de espermatozoides, super ovulación, transferencia de embriones, producción de embriones in vitro y clonación (Madan 2005); todas estas técnicas han permitido mejorar la eficiencia reproductiva, la cual repercute directamente en el rendimiento productivo del animal. Dichos procesos son comúnmente usados en los sistemas de producción de ganadería de leche y carne, equinos, porcinos, caninos, y además, han permitido la conservación de especies en peligro de extinción.

En el transcurso de la pasantía realizada en el laboratorio de Biotecnología animal del Politécnico Jaime Isaza Cadavid se desarrollaron tanto actividades en el laboratorio de Embriología como en el laboratorio de Andrología. Sin embargo, se realizó un apoyo más constante en el área de Embriología. Dichas actividades se explicaran en el presente capítulo, teniendo en cuenta un soporte bibliográfico. En la tabla 1, se señalan las actividades realizadas durante la pasantía, señalando nombre de la actividad, cantidad realizada por mes y total de actividades; es importante señalar que el primer mes fue de capacitación en los procesos; después de esto, las actividades señaladas en este capítulo fueron realizadas como pasante bajo la asesoría y supervisión de los profesionales a cargo.

Tabla 1. Actividades desarrolladas durante el tiempo de pasantía en el laboratorio de biotecnología animal del Politécnico Jaime Isaza Cadavid.

Actividad	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6	TOTAL
Inducción y capacitación en laboratorio	1						
Actividades en Embriología - FIV (Recolección de oocitos de matadero, selección, clasificación, maduración, fertilización)	8	8	8	8	1	8	41
Acompañamiento en campo a procesos de aspiración folicular. Profesional, Jaime Galindo	1	1	1	1			4
Actividades en Andrología (Colecta y evaluación de calidad seminal, criopreservación)	1	2	2	2	0	1	8
Participación en otras actividades (clases, conferencias, eventos)	x	X	x	X	x	x	

La participación en otras actividades corresponde a la asistencia a las clases de Reproducción I con el Docente Juan David Montoya; asistencia a las conferencias del XIV ENCUENTRO NACIONAL Y VII INTERNACIONAL DE INVESTIGADORES DE LAS CIENCIAS PECUARIAS - ENICIP 2017 y acompañamiento en la realización de charlas teóricas-prácticas impartidas por los profesionales del Politécnico; es estas charlas se me dio la oportunidad de orientar los temas de cronometría y pelaje en Equinos.

2.1. LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA.

Es importante recordar que la embriología es el estudio del crecimiento y diferenciación progresivo que tiene lugar durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Este comienza a partir de que se produce la fertilización del ovulo por parte del espermatozoide, dando lugar a la formación del cigoto

hasta el momento del nacimiento del ser vivo. Una vez que se han generado todas las principales estructuras y los órganos al embrión se pasa a llamar feto

En embriología, **las actividades realizadas como pasante** en el laboratorio fueron desde la recolección de oocitos de ovarios de matadero o de donantes (aunque en esto último, es por los servicios de extensión que presta el laboratorio con profesionales externos) hasta la fertilización y/o crio preservación del embrión; sin embargo, durante la pasantía se tuvo la oportunidad de asistir a procesos de aspiración de oocitos y procesos de sincronización de receptoras.

2.1.1. FERTILIZACIÓN IN VITRO: La actividad que más se realizan en el área de embriología es la **fertilización in vitro (FIV)**; como tal, esta técnica de biotecnología de la reproducción está basada en la maduración artificial de huevos no fecundados (oocitos) que generalmente provienen de los ovarios de vacas sacrificadas en mataderos o de procesos de aspiración folicular en vacas donantes; los que posteriormente son fecundados con espermatozoides (criopreservados); para que luego los cigotos resultantes se incuben en el laboratorio hasta la etapa de blastocito, los que finalmente serán transferidos a hembras receptoras o criopreservados por medio de vitrificación..

Como tal, la FIV es un proceso que se ha realizado con varias especies de animales domésticas, siendo los bovinos, la principal especie atendida en el laboratorio; sin embargo y en condiciones muy generales del conocimiento científico, la FIV es una herramienta que ha permitido junto con otros procesos, el manipular y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados, para la multiplicación in vitro de líneas de animales genéticamente superiores (Peláez 2011). Según lo reporta la literatura, el primer ternero nacido mediante esta técnica fue en el año de 1981 (Reyes 1995) y desde ese entonces se señala que la FIV permite obtener muchos embriones sincronizados a una etapa específica de desarrollo.

En cuanto a la FIV, en el laboratorio de biotecnología animal del Politécnico, se realizan los procesos de obtención de oocitos, búsqueda de oocitos, selección, clasificación, maduración de oocitos, fertilización y obtención de embriones y finalmente la criopreservación, procesos en los que se permite que el pasante participe activamente.

2.1.1.1. Recolección de oocitos. Como ya se mencionó, este proceso se puede realizar de dos formas, una es por medio de ovarios de matadero y otra por aspiración folicular en donadoras. Sin embargo, la forma más económica y común de obtener oocitos es a partir de ovarios de matadero, siendo una de las técnicas más prácticas y de mayor facilidad para dicha obtención.

a. Obtención de oocitos de ovarios de matadero: como tal en esta actividad se permite la participación del pasante, siempre en compañía de un profesional; este es el proceso que más se lleva a cabo en el laboratorio de Biotecnología animal del Politécnico; aproximadamente entre dos a tres veces por semana se visitó el frigorífico “Regional de Medellín”, en donde se tenía acceso a todos los úteros y ovarios de las bovinas hembras faenadas; una vez recolectados los ovarios, estos por protocolo del laboratorio, son colocados en un termo de transporte que contiene solución salina (0.9% NaCl), es importante que estos sean mantenidos a una temperatura entre los 28 a 30°C, ya que una temperatura menor a esta puede influir en la maduración in vitro (Lu, *et al*, 1987, Fry, *et al* 1997). Una vez en el Laboratorio, la obtención de los oocitos se puede llevar a cabo por aspiración con jeringa de los folículos superficiales mayores a 2mm, usando una jeringa de 5 o 10 ml y aguja hipodérmica estéril de pulgada y media; a la jeringa se le realiza un agujero en la parte superior y tres en la parte inferior de tal forma que estos agujeros hagan un estilo de forma de bomba vacío y haga la correcta succión. Posteriormente el líquido folicular es depositado en tubos cónicos de 50 ml; este procedimiento concuerda con lo reportado por Lonergan, P. *et al*. 1991.



Figura 8. Punción ovarios de matadero. Fuente: Autor

b. Obtención de oocitos de donantes por punción folicular (OVUM PICK-UP, OPU): a pesar que este servicio no se presta directamente por el laboratorio, como pasante se permite acompañar al Profesional Jaime Galindo de la Empresa “Reproduzca”, quien remite los oocitos obtenidos a este laboratorio, esto, si la distancia entre el lugar de aspiración al laboratorio no es mayor a 24 horas, tiempo que coincide con la maduración del oocito.

Como tal, la técnica OPU en bovinos fue desarrollada con el fin de obtener repetidamente oocitos de vacas previamente seleccionadas por su alto nivel genético (kruip et al. 1994), para así poder obtener crías con rasgos de producción conocida y así acortar el intervalo generacional en programas de cría (Pieterse. et al. 1998). Para este proceso de aspiración de oocitos se requiere de 3 elementos o equipos principales: un ecógrafo con un transductor sectorial, una bomba de aspiración y un sistema de guía de la aguja. El transductor y el sistema de la guía de la aguja son contruidos como una solo unidad, lo que permite que el extremo de la aguja pueda ser visualizado cuando penetra los folículos cercanos al transductor; dicha aguja está conectada mediante un sistema de conducción plástico a una bomba de vacío que permite que el contenido de los folículos sea aspirado.

En lo que respecta a los animales y según el protocolo del laboratorio; las vacas utilizadas en el proceso de aspiración folicular son animales de alto valor genético. Para su alistamiento, se debe lavar la vulva con abundante agua y

realizar un buen proceso de desinfección, además, todo el procedimiento se debe realizara bajo anestesia epidural para evitar el movimiento del recto durante el procedimiento. Luego, se realiza una palpación de inspección y se da inicio al procedimiento, para lo cual, la cabeza del transductor es fijada en posición cráneo dorsal, a la izquierda o derecha de la abertura externa del cérvix dependiendo del ovario que será puncionado (Figura 8), el producto de la aspiración es recolectado en tubos cónicos de 50ml con una solución de transporte que contiene una dilución del 1% de suero fetal bovino es decir 5 ml en 500 ml de solución salina; 0.5ml de antibiótico por cada 500 ml de solución salina y heparina de 0.1—0.3 por cada tubo cónico de 50 ml.

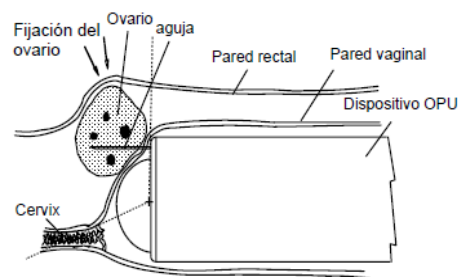


Figura 9. Colocación del ovario para la punción folicular, fuente: Palma

En cuanto a este proceso, durante el tiempo de pasantía se asistió a la realización de 4 aspiraciones foliculares con un total de 22 donadoras aspiradas (Tabla 5). Como actividades propias del pasante, se realizaba el alistamiento de los animales, equipos y en algunas ocasiones se hacia la búsqueda de oocitos en campo con el uso de un estereoscopio, para que luego estos fueran remitidos al laboratorio en su medio de cultivo.

Tabla 2. Aspiraciones foliculares durante la pasantía.

Municipio-Finca	No de animales aspirados
Municipio de Girardota	4
Finca Limonar (Municipio de Girardota)	5
Finca Las Mirlas (Municipio de Puerto Berrio)	6
Municipio de San Alberto-Cesar	7
TOTAL	22

Fuente: Autor

Las aspiraciones de Girardota, Limonar y Las Mirlas se remitieron para el laboratorio de biotecnología animal del Jaime Isaza Cadavid y las aspiraciones del municipio de San Alberto para el laboratorio Embriogem en la ciudad de Bogotá, esto debido a la distancia entre el lugar de aspiración y el laboratorio, ya que este tiempo puede influir en el proceso de maduración.

2.1.1.2. Selección y clasificación: los oocitos recolectados son seleccionados y clasificados en el laboratorio para ser madurados in vitro, esto se hace teniendo presente las características de su citoplasma y las células del cúmulus que lo envuelven.

En lo que respecta a las actividades como pasante, se señala que cada vez que se realizó colecta de oocitos (ya sea de matadero o de Donantes), se realizó la selección y clasificación de los mismos, es decir en este procedimiento se participó directamente entre dos a tres veces por semana durante todo el tiempo de pasantía más los procesos realizados comercialmente; para esta actividad se lleva a cabo el siguiente procedimiento: el producto de la colecta (oocitos de ovarios de matadero o de donantes por aspiración folicular) se mantiene en una placa térmica a una temperatura promedio de 38°C, al mismo tiempo se montan dos cajas de Petri, una para

realizar el proceso de filtrado y otra para pasar los oocitos que se clasificaran; en la primera caja de Petri se dispone una “piscina” con solución salina y sobre esta se deposita un filtro de cultivo celular por el cual se pasa el contenido de la colecta, haciendo de ser necesario, algunos lavados en el filtro con solución salina; es de aclarar que para el filtrado el filtro de cultivo se retira de la caja de Petri, con el objetivo de que el líquido sobrante sea descartado en un recipiente, y la caja de Petri con la solución salina sirve para colocar el filtro y así evitar la deshidratación de los oocitos capturados. Una vez realizado el proceso de filtrado el producto de esta se pasa con una pipeta de Pasteur a la segunda caja de Petri que también contiene solución salina y posteriormente se realiza la búsqueda y clasificación, la cual se lleva a cabo en un estereoscopio marca Nikon teniendo en cuenta las condiciones de clasificación señaladas en la tabla 3 y 4.



Filtro de cultivo celular



Caja de Petri 1 y 2

Figura 10. Elementos para la selección y clasificación. Fuente: Autor

Para la selección y clasificación de los oocitos, el laboratorio de Biotecnología animal del Politécnico tiene en cuenta dos sistemas de clasificación; la clasificación propuesta en el año 1979 por Leibfried y First, quienes formularon un esquema de clasificación de acuerdo a la apariencia de las células del cúmulus y del ovoplasma. De acuerdo a la apariencia de las células del cúmulus los oocitos se pueden clasificar en cuatro categorías (Tabla 3) y de acuerdo a la apariencia del ovoplasma los oocitos se pueden clasificar en tres categorías (Tabla 4). Sin embargo, aquellos oocitos que se presentan rodeados por menos de tres estratos de células del cúmulus, cúmulus no compacto y ovoplasma heterogéneos o picnóticos se clasifican como no aptos y son descartados para maduración in vitro (Xu, et al, 1987). En esto se puede señalar que la mayor capacitación como pasante, se realizó como buscador el Oocitos, permitiendo día a día adquirir más destreza.

Tabla 3. Clasificación de los oocitos de acuerdo a la apariencia de las células del cúmulus.

CATEGORIA / GRADO	CALIDAD	CARACTERÍSTICAS A EVALUAR
1	Bueno	Presentan tres capas compactas de células del cúmulus que los rodean en toda su superficie
2	Regular	Se presentan rodeados parcialmente por tres capas compactas de células del cúmulus
3	Malo	Se encuentran rodeados por células del cúmulus expandidas
4	Degenerado	Oocitos desnudos

Fuente: Leibfried, L., First, N 1979.

Tabla 4. Clasificación de los oocitos de acuerdo a la apariencia del ovoplasma.

CATEGORIA / GRADO	CALIDAD	CARACTERÍSTICAS A EVALUAR
1	Bueno	Presentan ovoplasma granuloso y homogéneo y que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida
2	Regular	Presentan ovoplasma granuloso no homogéneo, (periferia clara y centro oscuro) y que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida
3	Malo	Presentan ovoplasma vacuolado, fragmentado y que no llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida. Aquellos oocitos que con tres o más capas compactas de células del cúmulus que lo rodeen y ovoplasmas homogéneos, se clasifican como aptos y se seleccionan para maduración in vitro.

Fuente: Leifried, L., First, N 1979

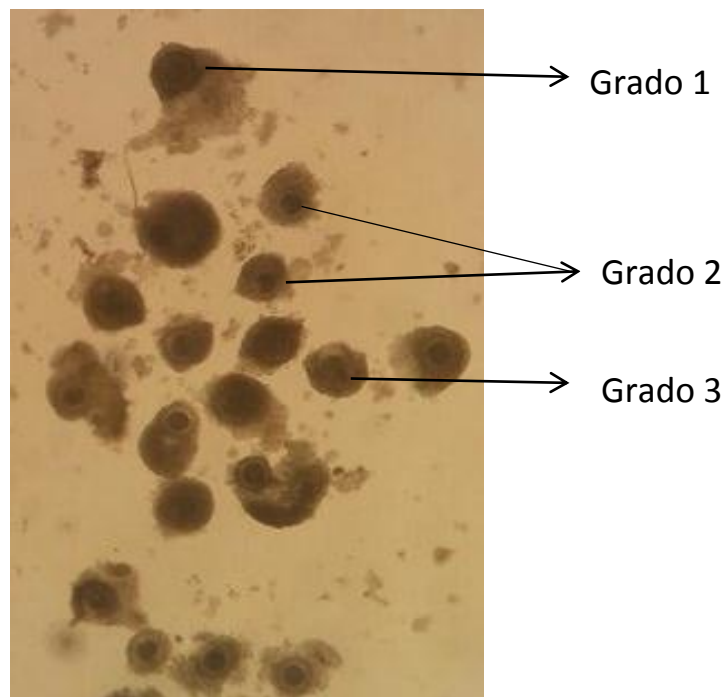


Figura 11. Imagen de oocitos con diferente clasificación. Fuente: Autor

2.1.1.3. Maduración de oocitos. En este proceso, los oocitos seleccionados y clasificados, se colocan en un medio de cultivo de 18 a 26 horas; sin embargo en el laboratorio de biotecnología del Politécnico se manejan 24 horas de maduración; es importante señalar que este tiempo se cuenta a partir de la hora de clasificación, como pasante, se tenía la responsabilidad de la realización de todo este proceso, siempre en compañía de un Profesional.

Como tal, la literatura reporta que en el proceso de maduración tanto *in vivo* como *in vitro* de los oocitos ocurren una serie de cambios que permiten la reanudación de la meiosis; estos eventos deben ocurrir antes de la fertilización y se caracterizan por la expansión de las células del cúmulus, la eliminación del primer corpúsculo polar y la formación de la metafase II (Hyttel, et al 1986). Para la maduración, se han desarrollado distintos medios de cultivo que van desde soluciones simples de sales balanceadas hasta medios complejos, aunque siempre se toma como referencia los componentes que están presentes *in vivo*, para proporcionar las condiciones ideales, con el fin de obtener el mayor porcentaje de oocitos madurados.

Algunos factores a tener en cuenta en la maduración son la osmolaridad, el pH y las hormonas que intervienen en el proceso, lo cual es provisto por el medio de cultivo y los gases de maduración. En los medio de cultivo, se puede encontrar un suministro de hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), estrógenos (estradiol), células somáticas para el co-cultivo (células del cúmulus, granulosa, teca interna, oviducto, y útero), aminoácidos, factores de crecimiento, suero de vaca en estro, suero fetal bovino (BFS), y seroalbumina bovina (BSA) (Gordon, I., y K.H. Lu. 1990).

En el caso particular, el medio utilizado en el laboratorio de biotecnología del Politécnico es el M-199, que está suplementado con gonadotropinas (FSH/LH), estradiol, suero sanguíneo y piruvato; con este medio se da altas frecuencias de maduración nuclear y expansión del cúmulus cuando se agrega FSH (Leibfried-Rutledge et al. 1986). Además el piruvato sódico contenido permite

prescindir de las células del cúmulus durante la maduración, puesto que se han obtenido blastocistos competentes para producir terneros viables tras la transferencia embrionaria utilizando este compuesto (Geshi, M., et al, T.2000). En los medio de cultivo, las gonadotropinas son necesarias para la maduración y desarrollo de los oocitos. La LH afecta a la maduración del oocito, altera la concentración de calcio dentro del oocito, aumenta la glucólisis y la oxidación mitocondrial de la glucosa dentro del oocito. La FSH estimula la actividad aromática de las células de la granulosa, haciendo que aumente el ambiente folicular estrogénico. (Hazeleger, N.L., et al 1995). Además, la FSH incrementa la expansión de las células del cúmulus, (Gordon, I., y K.H. Lu. 1990). Los estrógenos se necesitan para la maduración de los oocitos, sensibilizan los receptores de las células de la granulosa para responder a las gonadotropinas; utilizando células de la granulosa como co-cultivo donde hay efectos favorables del estradiol en el medio de maduración, el cual llega a ser evidente en el día 7 del estadio de desarrollo del embrión. (Gordon, I., y K.H. Lu. 1990). El suero de vaca en estro, el BFS y la BSA son fuentes proteicas, de aminoácidos y también contienen hormonas, factores de crecimiento, vitaminas y otras sustancias que el oocito y el embrión requieren para su desarrollo (Gordon, I., y K.H. Lu. 1990)

Aparte de los medios de cultivo también es necesario aportar un ambiente lo más similar posible a aquel en el que los oocitos maduran de forma natural. Para ello hay que considerar:

- La concentración de oxígeno en el ambiente y la de CO₂ (5%)
- La humedad relativa (95-100%)
- La osmolaridad de los medios utilizados (290 mOsm)
- El pH de los medios (7.4), y
- La temperatura, tanto a la que se procesan como a la que se cultivan (38,5 °C).

Para lo anterior, el laboratorio de biotecnología cuenta con las incubadoras, y tiene como tiempo medio de maduración 24 horas a partir de la clasificación.

Sin embargo, cuando las colectas se hacen de donadoras, el producto de la aspiración es seleccionado y clasificado en campo; luego se coloca en el medio de maduración y es enviado al laboratorio en una transportadora WTA®, la cual mantiene la temperatura a 38°C y las condiciones de pH y osmolaridad; esto se hace con el fin de que del tiempo de la colecta a la llegada al laboratorio se pueda hacer la maduración, esta actividad fue desarrollada como pasante bajo la supervisión de un profesional.

2.1.1.4. Fertilización y obtención de embriones: Tanto para condición *in vivo* como *in vitro*, previo a la fertilización de los oocitos, el semen debe estar capacitado y activado. La capacitación y activación del espermatozoide, posibilitará a este progresar a través de las células del cúmulus y penetrar la zona pelúcida (Yanagimachi, 1981). Estas actividades que son realizadas en el Laboratorio por los pasantes bajo la supervisión de los profesionales.

a. Capacitación de semen: La literatura reporta al menos cinco metodologías han sido descritas para la separación de los componentes del diluyente seminal de las células espermáticas y su selección.

Estas son:

- Lavado por centrifugación.
 - Swim-up.
 - Gradiente de percoll.
 - Filtración en columna con lana de vidrio.
 - Migración-sedimentación (Utsumi *et al*, 1981)
-
- El lavado por centrifugación resulta ser el método más sencillo de todos, en este el semen se centrifuga 2 veces a 500 gravedades durante 5 a 10 minutos (Fukuda. Et al, 1990); teniendo en cuenta que la centrifugación excesiva del semen congelado provoca alteraciones en la membrana

plasmática (Niwa et al, 1988; Sanchez et al, 1995; Rodriguez-Martinez, et al., 1997).

- El método de swim-up separa los espermatozoides motiles de los no motiles, basado en la motilidad de los primeros. para esto, una muestra de semen colocada en el fondo de un tubo que contiene medio de cultivo a 37°C, permitirá después de un tiempo de cultivo, que los espermatozoides móviles se desplacen hacia la superficie del tubo (Parrish y cols., 1986).

Un estudio realizado por Jaakma y cols. (1997) compara la separación de espermatozoides por swim-up en medio Fert-TALP suplementado con ácido hialurónico con el lavado por centrifugación B.O. (Brackett y Oliphant, 1975). Si bien los medios utilizados en las dos técnicas difieren entre sí, la técnica de separación por Swim-up fue más efectiva que de centrifugación.

- El gradiente de percoll está constituido por partículas coloidales de 15 a 30 nm de diámetro cubiertas con polivinilpirrolidona (PVP). El sistema de separación de Espermatozoides consiste en la colocación, en un tubo estéril, de 2 gradientes de percoll (55% y 90%) diluido en medio de cultivo Sperm-TALP. El semen se siembra en la parte superior del tubo y se centrifuga a 200g durante 25 minutos a temperatura ambiente (Avery y Greve, 1995) Algunas partidas de percolla utilizado, tienen efectos deletéreos sobre los espermatozoides. Este efecto es debido principalmente al PVP que rodea a las partículas coloidales. Sin embargo, estos autores proponen que este método es rápido, fácil de realizar y económico.
- El método de filtración en columna con lana de vidrio consiste en la separación de células espermáticas basado en la motilidad de los espermatozoides. La muestra de semen se coloca en la parte superior de un tubo cilíndrico de 10 a 15 cm de altura. Los espermatozoides móviles atraviesan la lana de vidrio y se recogen en el fondo del tubo (Stubbingns y wosik.1991)

En 1983 Tea, et al., informan sobre el método migración/sedimentación. El mismo, consiste en colocar la muestra de semen en la superficie de un tubo cónico ubicado dentro de otro tubo cilíndrico. Después de incubar 1 hora a 39°C, los espermatozoides móviles migran y sedimentan en el tubo cónico.

Para este proceso, el laboratorio de biotecnología animal del Politécnico, utiliza con mayor frecuencia la técnica de Gradiente de percoll.

b. Capacitación de los espermatozoides. La capacitación espermática involucra cambios bioquímicos en las membranas del espermatozoide, lo que permite la reacción acrosómica. Durante éste proceso, se produce el retiro del material que recubre la región acrosómica del espermatozoide dejando libres los receptores que interaccionan con las células del cúmulus y la zona pelúcida del oocito. Del mismo modo, se han descrito cambios en las propiedades de las membranas espermáticas: aumento del pH acrosomal, alteración en la proporción entre el colesterol y fosfolípidos y aumento en la permeabilidad al calcio (Yanagimachi, 1981).

Para la capacitación de los espermatozoides, se ha descrito la efectiva capacidad de unión que tiene la heparina y la concentración óptima de ésta para maximizar el grado de fertilización *in vitro*; ya que capacita a las células espermáticas, mediante el desplazamiento de las proteínas decapacitantes de la membrana plasmática y la estimulación de la apertura de los canales de calcio (Saeky y cols., 1995). Motivo por el cual en el laboratorio se usa la heparina como material para la capacitación.

c. Fertilización. En el laboratorio de biotecnología animal del politécnico se realiza el procedimiento que se detalla a continuación.

La fertilización consiste en la interacción entre los componentes del oocito y los del espermatozoide, activándose la segunda división meiótica del oocito y la

restauración del número cromosómico del futuro individuo. La descondensación de la cabeza del espermatozoide ocurre dentro de 1 a 2 horas de haber penetrado al oocito, y el pronúcleo masculino se forma de 3 a 5 horas (Gordon y Lu,1990). La concentración espermática en la FIV es de 0.5 a 1 millón de espermatozoides por mililitro (Gordon, al 1990). Y para lograr un buen porcentaje de fertilización se debe incubar por 24 horas después de la maduración y fertilización (Gordon, I., et al 1990). Si se observan los 2 cuerpos polares dentro del gameto femenino quiere decir que se llevó a cabo la fertilización.

En el laboratorio de biotecnología animal del Politecnico, la fertilización generalmente se realiza en microgotas de medio SOFT, a un pH de 7.8. También se utiliza PHE (penicilamina, hipotaurina y epinefrina) como estimulante de la motilidad espermática (Gordon, I., et al 1990). Antes de la fertilización generalmente se retiran las células del cúmulus de los oocitos maduros, y este proceso se puede realizar por pipeteo o con la adición de citrato de sodio al 3%, sin provocar ningún daño, para limpiar al oocito (Gordon, I., et al 1990).

Se mantiene los oocitos con los espermatozoides durante 24 h en 5 % CO₂, no es necesario corregir el pH, ya que los buffers carbonatados corrigen el pH.

Se adiciona una catecolamina como la epinefrina y un aminoácido sulfonado como la hipotaurina al medio de cultivo, esto es benéfico para la fertilización en vacunos, las catecolaminas aumentan la motilidad espermática y la hipotaurina ayuda a la reacción acrosomal, estos componentes son encontrados también in vivo por lo que se puede pensar que tiene importancia en el tracto reproductivo de la hembra.

d. Cultivo de embriones. En el laboratorio del politécnico el cultivo se realiza en cajas Petri donde son colocadas gotas de 15 micras de medio SOFT en aceite mineral, ahí se depositan los oocitos ya madurados, posteriormente se hace la aplicación del semen ya capacitado luego se deja en la incubadora

durante 24 horas, cumplido este tiempo se renueva el medio para así lograr sacar el contenido de sobra en cada gota (espermatozoides muertos que no lograron el ingreso al oocitos). La feeding se realiza cada 48 horas por 8 días. Como pasante este proceso se realizaba cuando los proceso no eran de tipo comercial.

En este proceso se usan iones inorgánicos en los cultivos, las funciones de los iones inorgánicos son catalíticas y fisiológicas. La composición iónica de la mayoría de los medios de cultivo se basa en el análisis bioquímico de la sangre o del líquido oviductal, así es como ejemplo el medio de Fluido Oviductal Sintético (SOFT; Tervit, 1972). Sin embargo, no hay que olvidar que el fluido oviductal no resulta ser un simple filtrado de plasma (Leese, 1988). La composición iónica, el pH, la osmolaridad y el contenido de macromoléculas contenidas en el líquido oviductal difieren enormemente de los del plasma sanguíneo (Gandolfi et al, 1989). Está generalmente aceptado que el cloruro sódico es necesario para regular la osmolaridad del medio de cultivo, y que el calcio y el potasio son esenciales para el desarrollo embrionario, siendo muy efectivos en un rango muy amplio que va desde 0.4 a 10 mM. La ausencia de calcio en el medio de cultivo resulta en una reducción de las divisiones embrionarias y en una incapacidad para la compactación de las mórulas. Cationes como el Ca^{++} y Mg^{++} , así como las glicoproteínas, juegan un papel importante en el proceso de adhesión celular. El fosfato parece ser efectivo solo a una muy determinada concentración de 0.35 mM en los medios de cultivo para embriones bovinos (Kim et al., 1993).

El medio de cultivo usado en el laboratorio contiene: sustratos energéticos, aminoácidos y vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, proteínas de origen biológico y antibióticos, a continuación se detallara cada contenido y sus funciones en el medio de maduración

- **Sustratos energéticos.** Las fuentes de energía más comunes en el medio de cultivo son el lactato, el piruvato y la glucosa. Todos estos sustratos se han encontrado en el líquido oviductal, sus funciones difieren en los medios de cultivo de las diferentes especies animales y en los diferentes estadíos de

desarrollo. En los estadios más tempranos (embriones de 1-2 células) se utiliza el piruvato y/o el lactato pero no la glucosa. De hecho, la adición de glucosa a los embriones bovinos fertilizados de una célula cultivados en SOF resulta en un descenso del desarrollo embrionario posterior (Takahashi y First, 1992), así como en una desviación en la proporción de sexos de los embriones bovinos producidos in vitro (Gutiérrez Adán et al., 2001). Otras fuentes de energía, incluyendo la glucosa, son utilizadas a partir del estadio de 8 células. Ha quedado claramente demostrado (Rieger et al, 1992) que los embriones bovinos utilizan la glucosa como principal fuente de energía desde las 8 células hasta el estadio de blastocisto. Kobayashi et al, (1994) han reportado que se incrementan los blastocistos bovinos producidos in vitro utilizando bajas concentraciones de glucosa en el medio (0.4 mg/ml) en combinación con una baja (5%) tensión de oxígeno. El piruvato-glucosa puede llegar a ser sustituido por una mezcla de piruvato-ribosa e incluso en algunos medios determinados por galactosa.

- **Aminoácidos y vitaminas.** Los medios de cultivo más frecuentemente utilizados, como son el Ham's F-10 o el **TCM-199**, contienen del orden de 20 aminoácidos, sin embargo, aún están poco definidas sus funciones en los medios de cultivo. Normalmente los 20 aminoácidos están implicados en la síntesis proteica. Si a los medios de cultivo solamente se les enriquece con una gran cantidad de aminoácidos esenciales, una porción de ellos se degradarán para proveer de una fuente de nitrógeno que sirva para la síntesis de aminoácidos no esenciales.

Se acepta de forma general que los aminoácidos sirvan como fuente de energía, tampones intracelulares del pH, y como "pool" para la síntesis proteica. Se ha demostrado que el cambio de ciertos aminoácidos, así como la inclusión de otros puede llegar a mejorar las condiciones de cultivo (Keskintepe et al., 1995; Steeves y Gardner 1999). Muchos de los aminoácidos nutricionales, como la fenilalanina, tirosina, lisina, valina y treonina son apenas utilizados por las células embrionarias (Eagle, 1959), mientras que otros, como la glutamina, son activamente metabolizados y muy utilizados como fuente de

energía durante el desarrollo embrionario (Rieger *et al.*, 1992). Sin embargo, en otros estudios, al suplementar con los 20 aminoácidos esenciales y con aminoácidos no esenciales, el resultado fue que se incrementó el desarrollo embrionario (Takahashi y First, 1992) y se vio que la acción de los aminoácidos sobre el desarrollo embrionario era dependiente del estadio de desarrollo (Kim *et al.*, 1993; Lane y Gardner, 1997).

Las vitaminas juegan un importante papel como coenzimas en el metabolismo de los carbohidratos y de los aminoácidos (Lehninger, 1975), igualmente está demostrado que las vitaminas hidrosolubles son necesarias para la expansión del blastocisto y la salida de la zona pelúcida en los embriones de hámster y de conejo (Kane *et al.*, 1988). Pero, por encima de todo, los efectos de las vitaminas sobre el crecimiento de los embriones bovinos han resultado generalmente no concluyentes (Takahashi y First, 1992). La Colina e Inositol, generalmente incluidas como vitaminas, y estas juegan un papel de substratos más que de catalizadores. La colina es un precursor de la fosfatidilcolina y de la esfingomielina, dos de los mayores fosfolípidos estructurales de la capa exterior de las membranas embrionarias.

- **Hormonas.** Existe una clara evidencia de que algunas hormonas, como la insulina, tienen un gran efecto sobre el desarrollo de los embriones. Así, la adición de insulina a los medios de cultivo resulta en un incremento de las tasas de desarrollo morfológico y del transporte de glucosa al blastocisto (Gardner y Kaye, 1991). A la vista de la microscopía electrónica, en la supervivencia post descongelación y los porcentajes de gestación, la adición de insulina y selenio a los medios de cultivo de embriones bovinos, resultan en una mayor calidad de los blastocistos (Shamsuddin *et al.*, 1993).

- **Factores de crecimiento.** Entre un gran número de factores de crecimiento que tienen un papel importante en la proliferación celular del embrión, los más importantes parecen ser los relacionados con los factores de insulina (insulin-like growth factors; IGF), los de transformación (transforming growth factors; TGF) y los epidérmicos (epidermal growth factors; EGF). Los péptidos de IGF

afectan al transporte de membrana y a las actividades enzimáticas en las células embrionarias. La IGF-I y la insulina se ha demostrado que incrementan la producción estrogénica en los embriones de cerdo en cultivo, lo cual es necesario para la transición del estadio de mórula al de blastocisto (Hofig *et al.*, 1990). La adición de TGF-B al medio de cultivo también estimula las actividades mitóticas en la masa interna celular del blastocisto (ICM), sobre todo cuando el embrión se encuentra en un estadio inicial de blastocisto (Marguant-LeGuaienne *et al.*, 1989). La familia de los EGF de los factores de crecimiento se ha visto que causan un incremento significativo en el desarrollo en los embriones bovinos de 2 a 8 células, así como en el paso de mórula a blastocisto (Yang *et al.*, 1993). Por otra parte, un estudio realizado por Shamsuddin. *et al.*, (1993) demostró que los EGF no estimularon el desarrollo embrionario hasta el blastocisto pero que si incrementaron la ruptura zonal de los blastocistos.

- **Proteínas de origen biológico.** Una forma de suplementar proteínas a los embriones *in vitro* es mediante la adición al medio de suero fetal (FCS) o de albúmina del suero bovino (BSA), los cuales son usualmente añadidos a la mayoría de los medios de cultivo embrionario. Estos dos compuestos realizan un papel similar, aunque no del todo conocido y ambos están compuestos de una forma muy variable, debido a la escasa definición de sus componentes (Bavister, 1992). El suero fetal y la BSA afectan al pH del medio y actúan como quelantes de iones metálicos, contienen factores de crecimiento y ciertas cantidades variables de hormonas que inciden en la proliferación y diferenciación celular (Ball *et al.*, 1985), además sirven como agentes activos de superficie (Palasz *et al.*, 1995). Las proteínas biológicas que contienen acarrear un peligro potencial de contaminaciones cruzadas y de esta manera los embriones pueden aparecer infectados con virus y otros patógenos provenientes de las donantes de las proteínas (Rossi *et al.*, 1980). Debido fundamentalmente a este hecho, la posible contaminación, además de su variable aportación en cuanto a constituyentes y funciones, los medios con productos biológicos deberían ser sustituidos por medios definidos que permitieran similares tasas de crecimiento embrionario *in vitro*.

- **Antibióticos.** Los medios de cultivo suelen ser complementados de forma estandarizada por 0.1% de antibióticos para suprimir el crecimiento de microorganismos contaminantes y para prevenir la expansión de patógenos. Aunque no son necesarias altas concentraciones de antibióticos, 10 veces la concentración normal de Penicilina G y de Estreptomicina durante 72 horas se ha visto que no resulta toxica para los embriones a 37° C (Riddel *et al*, 1985). De cualquier manera no está recomendado que se incluyan en los medios antibióticos almacenados durante largos periodos de tiempo, ya que la vida media de la mayoría de los antibióticos se encuentra entre los dos días a las dos semanas, dependiendo del tipo de antibiótico y de la temperatura de almacenamiento.

Durante el proceso de cultivo se realiza una previsión la cual consiste en hacer una evaluación del número de células de cada embrión (tabla 5), esto con el objetivo de dar un aproximado de embriones a obtener, esta previsión se realiza cada 24 a 48 horas, coincidiendo con la feeding; esta actividad es realizada como pasante, al inicio se hace solo con el acompañamiento de un Profesional y luego de adquirir la suficiente destreza, este proceso se hace solo.

Tabla 5. Evaluación de embriones por día

DIA	ESTADO
0-1	1 célula
2	2celulas
2-3	4 células
3-4	8 células
4-5	16 células
5-6	Mórula temprana
6-7	Mórula compacta
7-8	Blastocisto
8-9	Blastocisto expandido
9-10	Blastocisto eclosionado

Fuente: Yaiza Martínez 2013

2.1.1.5. Criopreservación de embriones. En cuanto a los procesos de criopreservación de embriones, el laboratorio del politécnico usa la vitrificación como método para la conservación del material genético, en esta actividad como pasante se participó en 3 vitrificaciones.

La criopreservación es el proceso por el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente a la temperatura de ebullición del nitrógeno líquido (-196°C), para disminuir las funciones vitales de una célula u organismo y poder mantenerlo en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo. Esta técnica presenta ventajas biológicas y comerciales, permitiendo transportar embriones a cualquier lugar del planeta donde se encuentren las vacas receptoras; logrando muy buenos porcentajes de preñez que varían según la calidad del embrión y la técnica aplicada (Belascolain, et al ,2010)

El uso de la criopreservación de embriones dentro del proceso de transferencia de embriones, brinda una herramienta de suma utilidad, ya que a través de esta técnica podemos conservar durante un prolongado período de tiempo un embrión de excelente calidad, que permite utilizarlo cuando y donde se produzcan las condiciones favorables para lograr la preñez de las receptoras, o ser usada en algún lugar lejano de donde fue colectado. Desde la primera criopreservación de embriones de mamíferos lograda con éxito en los años 70, este campo ha alcanzado grandes avances, todos dirigidos a estandarizar técnicas simples y rápidas en su ejecución, económicas, aplicables a campo y lo más importante, que ocasionan el menor daño posible al embrión (Cabrera P.et al. 2006.)

a. Crioprotectores (CP). Un crioprotector es un compuesto químico que permite la mantención de un tejido o de células por mucho tiempo cuando se las mantiene a baja temperatura. Los crioprotectores difieren en la velocidad para penetrar los tejidos, el grado de protección al cristal de agua que confieren y por la toxicidad química que pueden tener sobre las células. El grado de

protección a las células está directamente vinculado al grado de asociación que tengan con el agua molecular. A mayor afinidad, menor el agua disponible para la cristalización dañina. Además, estos productos se utilizan en conjunto con los medios nutritivos líquidos que conforman las mezclas congelantes.

- **Permeables o intracelulares:** De bajo peso molecular, Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma.

- **Impermeables o extracelulares:** De alto peso molecular, polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano sorbitol, sacarosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azúcares. Estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua.

A su vez éstos se dividen en impermeables de alto y de bajo PM, los de bajo PM deben combinarse con los permeables para proteger efectivamente a las células durante el congelado. Los de alto PM protegen a las células durante congelado y descongelado alterando la formación de cristales de hielo a un tamaño y forma inocua.

Los crioprotectores previenen la deshidratación total y la degeneración proteica (causada por la congelación del agua intra y extracelular durante el proceso). Además, no deben ser tóxicos a los embriones. Para reducir el daño osmótico y tóxico del crioprotector, debido a la alta concentración de sales, se está dejando de utilizar G y DMSO para hacer uso de EG, solo o en combinación con sacarosa o trealosa que ha demostrado ser menos tóxico. El DMSO es muy tóxico a temperatura ambiente, pero si se aplica a baja temperatura es el 5 que

posee mejor resultado, lo que lo hace muy riesgoso por lo que no se recomienda usarlo. Dado su bajo peso molecular, el EG tendría una mayor velocidad de penetración y, por ende, necesitaría menor tiempo de exposición, disminuyendo su efecto tóxico.

El estado de desarrollo embrionario tiene gran incidencia en la velocidad de penetración del crioprotector. Al respecto, Leibo (1977) demostró que la permeabilidad de los embriones a los crioprotectores se incrementa luego de la fecundación, aumentando a medida que el desarrollo embrionario progresa. Esto se debería a la diferencia que existe en la relación área/volumen en un embrión en los primeros estadios del desarrollo.

c. Vitrificación. Como ya se mencionó, el laboratorio del politécnico realiza para la criopreservación, la técnica de vitrificación. La vitrificación es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones. La solución vitrificante (SV) lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. Al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de ahí su nombre. Todo el procedimiento desde el equilibrio hasta la inmersión en NL (nitrógeno líquido) no requiere más de 10 minutos. En condiciones prácticas, la vitrificación se logra mediante la inmersión directa en NL. Esto representa una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 2500°C/min, resultando necesario el empleo de soluciones altamente concentradas de uno o más CP permeables que pueden ser tóxicas para las células (Cabodevila J., Teruel M., 2001).

Durante el proceso de vitrificación, el embrión está sometido a deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante el descongelamiento. Esto se debería a que a medida que desciende la temperatura, se va formando mayor número de cristales de hielo provenientes de agua pura intracelular, y así la concentración del soluto va aumentando en los espacios que aún no se

congelan. Este choque osmótico es conocido como "efecto solución", y puede llegar a ser dañino para la sobrevivencia del embrión debido a la pérdida del equilibrio de las soluciones intra y extracelulares, respuestas químicas y osmóticas de las células a dichos efectos. El máximo daño en el embrión durante el enfriamiento ocurre de -15 a -16 °C debido a la fase de transición de la membrana lipídica. Esta fase se ve afectada por la fusión de los liposomas afectando el termo comportamiento de las membranas en la transición de líquido a gel y la velocidad de penetración de los crioprotectores. El daño celular incluye pérdida de microvellosidades, disrupción de la membrana plasmática, cambios mitocondriales, hinchamiento del retículo endoplásmico, pérdida de uniones entre células así como fractura de zona pelúcida. La etapa del desarrollo más apropiada para la vitrificación en etilenglicol es la mórula compacta y blastocito temprano de embriones producidos in vivo o in vitro, así como también se ha demostrado que embriones producidos in vitro tienen menor tolerancia a la congelación debido a la formación de hielo intracelular, aumento en la concentración de lípidos y enzimas que digieren la zona pelúcida, lo que los hace más sensibles al enfriamiento y a la invasión de virus, bacterias y hongos, motivo por el cual es que se usa la vitrificación. Otro aspecto a considerar es la calidad de los embriones a vitrificar, ya que cuando se congelan embriones de buena calidad, se obtienen mejores resultados que cuando se congelan aquellos de calidad regular.



Figura 12. Soporte de vitrificación. Fuente: autor

El laboratorio del politécnico utiliza como medios de vitrificación: 1. solución de equilibrio: dimetilsufoxido, etilenglicol, sacarosa. 2. solución de vitrificación: etilenglicol, dimetilsufoxido, sacarosa. Como tal son, las soluciones están

compuestas por las mismas sustancias, y en estos solo se cambia es la concentración.

- **Técnicas de Vitrificación.** Antes de la vitrificación, los embriones deben ser equilibrados con el Crioprotectores a temperatura ambiente. La técnica descrita por Sheffen, et al. en 1986 indica que la exposición a la solución de equilibrio (SE) (10% G + 20% PG en PBS) debe realizarse a temperatura ambiente (20 °C), durante 10 minutos y la exposición a la SV (25% G + 25% PG) a 4 °C. Dobrinsky et al. en 1991 deshidrataron al embrión en SE (10% G y 25% PG) por 7 minutos a 20 °C, pasando a SV (25% G y 25% PG) manteniendo la misma temperatura hasta introducirlo al NL.



Figura 13 vitrificación. Fuente: Autor

- **Calentamiento rápido de los embriones hasta temperaturas fisiológicas para su transferencia a las receptoras.** Esta técnica se realiza en el laboratorio del politécnico y como pasante se realizó en una sola oportunidad.

El agua vitrificada mantiene la misma distribución iónica y molecular que en estado líquido, por lo cual, si al calentar la muestra el movimiento molecular no se recupera rápidamente, existe el riesgo que se establezcan los procesos de nucleación homogénea o heterogénea, así como de crecimiento a partir de pequeños núcleos formados durante la vitrificación (Wowk, B. et al 2000). Por

este motivo, durante el calentamiento, se necesita alcanzar altas tasas de ascenso térmico. Rall y Fahy. 1985. observaron que los mayores porcentajes de sobrevida embrionaria se obtuvieron cuando el calentamiento se efectuó de modo rápido (2.500°C/minuto). En la práctica, estas tasas se logran introduciendo la pajilla en un baño María a 20°C (Saíto, N.; et al 1994) o a temperaturas comprendidas entre los 30 y 39°C durante pocos segundos (Leoni, G, et al 2002).

- **Extracción de los Crioprotectores.** Una vez calentadas las pajillas, los crioprotectores penetrantes deben ser retirados de los embriones, e inmediatamente, éstos deben rehidratarse. Por ello, se debe utilizar un buffer osmótico, en una concentración suficiente para alcanzar una osmolaridad ligeramente inferior a la de la solución de vitrificación. Este buffer (sacarosa), puede o no estar contenido en la misma pajilla. Massip et al. 1987 utilizaron una pajilla con una de las columnas de medio con sacarosa 1 M. Al descargar el contenido de la pajilla en una placa, la sacarosa previno el rápido influjo de agua al embrión y la muerte celular. A diferencia de esto, Kuwayama et al 1992 propusieron descargar el contenido de las pajillas en un placa con una solución de TCM 199 + 1 M de sacarosa a 15°C, ya que las mismas no contenían ninguna columna con sacarosa. En ambos experimentos, se obtuvieron aceptables tasas de sobrevida embrionaria. Vajta et al 1992 perfeccionaron un sistema parecido al One Step denominado "dilución en pajilla", en el cual una vez calentados, los embriones son mezclados con el medio de dilución (extracción del crioprotector) dentro de la pajilla y mantenidos en ella hasta 30 minutos. Saha et al.1996 utilizaron una solución de vitrificación compuesta por 40% EG, 11,3% trehalosa y 20% polivilpirrolidona y obtuvieron un 60% de parición transfiriendo directamente el contenido de las pajillas en receptoras sin remover los crioprotectores en ningún momento. En la metodología OPS (Vajta, G. 1996), las pajillas se retiran del NL e inmediatamente, el extremo que contiene los embriones, se introduce dentro de una solución compuesta por 0,25 M de sacarosa + 20 % de suero en TCM 199 durante 3 minutos. Trascorrido este tiempo, los embriones son colocados en una solución con 0,15 M de sacarosa durante 1 minuto. Todos los pasos descriptos se efectúan sobre platina térmica a 37°C. Una variante a esta metodología fue introducida un año

más tarde por Vajta et al 1997 en la cual el extremo delgado de las pajuelas es introducido en una pajuela de 0,5 ml que contiene una solución con 0,2 M de sacarosa. Con este sistema, el calentamiento y la dilución en la pajilla posibilitaría la transferencia de los embriones sin necesidad de trabajar bajo lupa.

2.1.1.6. Sincronización de receptoras. La sincronización de receptoras es uno de los procesos de más importancia en el éxito del proceso, debido a que debe hacerse una correcta selección teniendo en cuenta el fin de la producción en la que se está trabajando (carne-leche). Según Rowson *et al* 1972, la transferencia de embriones puede realizarse sobre un celo natural o un celo inducido, donde para tener buenos resultados este celo no debe ser mayor a 48 horas con el de la donante siendo el ideal un celo no mayor a 24 horas; en general en todo proceso de sincronización de receptoras se deben sincronizar mínimo 8 receptoras dado que algunas pueden ser descartadas antes de dicha transferencia por diferentes razones: quistes ováricos, celos anovulatorios (Cabodevila J. 2001).

A pesar de que el laboratorio de biotecnología animal de Politécnico Jaime Isaza Cadavid, no realiza directamente los procesos de sincronización de celos; durante la estancia de la pasantía se prestó un servicio de sincronización el cual estuvo a cargo del pasante. Esta actividad se realizó en la finca el limonar y de 21 vacas a las que se les realizó palpación rectal, 17 salieron aptas para realizar la sincronización.

La sincronización de estos animales se llevó a cabo según el protocolo de sincronización de receptoras del laboratorio del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. En la aplicación de este proceso el laboratorio recomienda el uso de agujas desechables nuevas, lavar y secar bien el área de la vulva antes de introducir el DIB; las aplicaciones de Hormonas se recomienda Intra-muscular (IM) profunda a la hora indicada y no modificar los horarios establecidos;

disminuir al máximo el manejo de los animales hasta la próxima palpación. Al momento del retiro de los dispositivos los que sean nuevos y que vayan a ser usados en un segundo proceso son lavados en una solución clorada al 5% para lo cual se disuelve medio litro de hipoclorito en 10 litros de agua, se dejan secar en la sombra y luego se almacenan en una bolsa oscura en un lugar seco y fresco.

Tabla 6. Protocolo de sincronización de receptoras

Día	Proceso
0	DIB + 2 cm de benzoato de estradiol
8	Remover Dib + 3 Closprostenol®+Novornon®+ 1 Cypiosin®
10-11	Detección de celos

Fuente: Empresa Reprodúzca® Jaime Galindo

En los procesos de sincronización, el Dispositivo intravaginal Bovino (DIB), se aplica, ya que la progesterona liberada a partir de la colocación del dispositivo permite la manipulación y sincronía de la dinámica folicular ovárica, los niveles supraluteales (>1ng/mL) obtenidos a los pocos minutos de la introducción del dispositivo provocan la regresión del folículo dominante y aceleran el recambio de las ondas foliculares, este cese de la secreción de productos foliculares (nitrógeno e inhibina) produce el aumento de FSH que va a ser responsable del comienzo de la emergencia de la siguiente onda folicular. Por otro lado la extracción del dispositivo provoca la caída de progesterona a niveles subluteales

En este tipo de protocolos los DIB se administra junto a benzoato de estradiol para controlar la dinámica folicular y al ser retirados se aplica prostaglandina, gonadotropina coriónica equina (ECG), ciprionato de estradiol con el objetivo

de controlar la ovulación , se asume que el celo ocurre al día siguiente de la extracción de los dispositivos y al momento de la transferencia embrionaria se debe descartar aquella receptora que no tenga un cuerpo lúteo mayor a 15mm (Cutaina *et al* 2000; Tribulo *et al* 2000).

2.2. ANDROLOGIA

En lo que respecta a las actividades en el Laboratorio de biotecnología animal del Politécnico en el área de andrología, se realizaban los procesos desde la colecta del semen (y todo lo que esto implica, como las evaluaciones respectivas) hasta la congelación. En total como pasante se realizaron 8 actividades completas en el área de andrología; en estas actividades como pasante se tenía una participación activa, permitiéndose realizar todos los procesos que se describirán a continuación.



Figura 14. Laboratorio andrología. Fuente: autor

2.2.1 CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN BOVINO. La crioconservación es la rama de la criobiología por medio de la cual se espera indefinidamente el potencial total de vitalidad y las funciones metabólicas normales de las células. Por medio de este proceso se busca la estabilización de las células a temperaturas criogénicas (-196°C), en las que se detiene la actividad metabólica, permitiendo su preservación por periodos de tiempo indefinidos (Cruz *et al.*, 2006).

El proceso de criopreservación de semen bovino en el laboratorio incluye los siguientes aspectos, en los cuales se participó activamente como pasante:

- Colecta
- Evaluación del semen
- Cálculo del número de pajillas posible
- Dilución del semen al volumen requerido
- Crio preservación.
- Evaluación pos congelación

Procesos que serán explicados en los siguientes apartes, con el respectivo apoyo bibliográfico.

2.2.1.1. Colecta. En el proceso de colecta se realiza un examen en donde se hace una evaluación de los órganos genitales externos y evaluación de los órganos internos; dicha actividad estaba a cargo del pasante y era supervisada por un profesional del área de Andrología.

2.2.1.1.1 Evaluación de órganos externos: En esta actividad se realizaban los procesos de evaluación completa de pene, prepucio, escroto, testículos, epidídimos, y medición de la circunferencia escrotal.

a. Pene y prepucio: el pene es el órgano copulador del macho y se le debe realizar una evaluación anatómica y funcional, en la evaluación anatómica se debe identificar heridas, traumas o inflamaciones. En la funcional se presta atención a los mecanismos de exteriorización, erección y reintroducción del pene, mucosa y patologías. Se han señalado algunas anormalidades en el pene que son motivo de descalificación, como hipoplasia del glande, duplicación parcial o total del pene, ausencia total de la flexura sigmoidea, persistencia del frenillo, entre otras.

b. Escroto: la inspección del escroto revela información sobre el estado de los testículos. El escroto debe ser simétrico, la asimetría a menudo refleja diferencias en el tamaño testicular. Se observará la piel buscando que esté libre de lesiones, heridas, cicatrices, adherencia, calor y sensibilidad que pudieran comprometer la salud de los testículos. Tanto los animales Bos indicus (cebú y sus cruces), como los Bos Taurus (razas europeas), presentan mecanismos de adaptación al medio ambiente tropical, el cual se caracteriza por poseer escrotos muy péndulosos, haciéndolos propensos a tener lesiones por traumatismos. Rosemberger, G. 1981.)

c. Testículo: en los machos los testículos son los órganos genitales de mayor importancia porque es el sitio donde se originan los espermatozoides. En ellos se produce la testosterona, importante para la espermatogénesis, comportamiento sexual, crecimiento genital y corporal. El testículo es de forma ovoide, turgente y elástico. Cuando el testículo presenta una consistencia dura o fibrotica indica que existieron procesos inflamatorios, mientras que una consistencia muy blanda señala una alteración en el curso de la espermatogénesis.

d. Epidídimos: la evaluación de los epidídimos se debe hacer por palpación al momento de realizar el examen de los testículos. El epidídimo es el lugar donde se almacenan los espermatozoides producidos por los testículos; igualmente, es el lugar donde maduran los espermatozoides y adquieren la capacidad potencial para fertilizar. El órgano está adosado en cada testículo y anatómicamente consta de tres porciones: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza del epidídimo se encuentra en el polo superior del testículo y se debe evaluar su forma, simetría y consistencia (tenso-firme-elástica). Seguidamente se continúa con el cuerpo del epidídimo, el cual se sitúa en la cara dorso lateral medial de la glándula y se palpa como una banda de un centímetro de ancho aproximadamente, al cual se le evalúa su ubicación, tamaño, forma y consistencia. La evaluación del epidídimo termina en la cola, porción que tiene forma cónica y una amplitud aproximada en su base de dos a tres centímetros,

la consistencia de la cola es normalmente firme y su abultamiento dependerá de su repleción con espermatozoides. (Salisbury, GW; 1982)

e. Circunferencia escrotal: se ha demostrado una alta correlación entre el peso de los testículos y la circunferencia escrotal, así como entre el peso de los testículos y la producción de espermatozoides, igualmente entre la circunferencia escrotal y la calidad de eyaculado (Morillo, M et al 2012). Por esta razón, al seleccionar toros con una circunferencia escrotal mayor, indirectamente, estamos seleccionando por producción de espermatozoides, esta característica tiene una heredabilidad alta de 0,65. La medida de la circunferencia escrotal también permite determinar la edad de la pubertad y algunas patologías testiculares. Se ha señalado que los descendientes de toros con circunferencia escrotal alta, alcanzan la pubertad a edades más tempranas (Gilardi SGT 2001). La circunferencia escrotal se mide con una cinta metálica especial, la cual se debe colocar en el diámetro más ancho de los testículos, después de haberlos desplazado hacia el fondo del escroto. Como guía para la selección de animales reproductores basados en su circunferencia escrotal, se pueden utilizar los requerimientos de la Sociedad Americana de Theriogenología, los cuales indican un mínimo 30 centímetros para animales Bos Taurus, con edades comprendidas entre 12 y 15 meses, y para animales Bos indicus, con edades comprendidas entre los 18 y 20 meses. De igual manera, se puede considerar como mínimo 30 centímetros de circunferencia escrotal a los 15 meses y 34 centímetros a los 24 meses o más, respectivamente. Cuando se trabaja con animales doble propósito, entonces, se debe exigir por lo menos 30 centímetros a los 24 meses y no menos de 32 centímetros a los 36 meses o más. (Salisbury et al. 1982)

Tabla 7: Promedio de la circunferencia escrotal en toros de acuerdo a los rangos de edad

Edad (meses)	Centímetros(cm)
≤15	30
>15<18	31
>18<21	32
>21<24	33
>24	34

FUENTE: *Salisbury et al. 1982*

2.2.1.1.2. Evaluación de órganos internos: En esta actividad se realizaban los procesos de evaluación completa por medio de palpación rectal de estructuras internas, como lo son las glándulas sexuales accesorias (próstata, vesícula seminal) y uretra.

En la inspección, en el centro del piso de la cavidad pélvica se localiza la uretra pélvica; esta se siente como una estructura firme, cilíndrica y aplanado dorso ventralmente de tres a cuatro centímetros de diámetro aproximadamente. En la parte anterior de la uretra pélvica se encuentra una elevación de perfil triangular, esta es la próstata, la cual es palpable sólo en la porción del cuerpo, ya que el resto de la glándula se encuentra diseminada entre los tejidos de los músculos que cubren la uretra pélvica. Las glándulas vesiculares o vesículas seminales son pares, de forma lobulada y se pueden ubicar, colocando la mano, desde el extremo anterior de la uretra pélvica y realizando suaves movimiento laterales (Roberts, SJ. 1986).

2.2.1.2. Recolección de semen. La recolección de semen se realiza por el método fisiológico de la vagina artificial o por el método físico de la electroeyaculación. Ambos procesos realizados en el laboratorio del politécnico, como actividad del pasante.



Figura15.Colecta por vagina artificial. Fuente: Autor

En el método de la vagina artificial se requiere de la utilización de un animal para la monta, como se observa en la Imagen 15 (macho o hembra) o un maniquí y una vagina artificial; este método simula la monta natural y permite la obtención de una muestra de semen de excelente calidad, que se puede considerar como característica de la eyaculación de un toro. Además, tiene la ventaja que permite la observación del comportamiento del animal en movimiento y durante su apareamiento. La vagina artificial consiste en un tubo cilíndrico de plástico rígido y resistente, de siete centímetros de diámetro y 35–40 centímetros de largo, recubierto internamente por una camisa de goma que se dobla sobre los extremos del cilindro formando una cámara que se llena con agua caliente (45–46 °C) y aire, con el fin de proveer el estímulo adecuado de temperatura y presión, lográndose así la eyaculación. En uno de los extremo de la vagina artificial se coloca un embudo de látex o goma que sostiene en su extremo un tubo graduado, el cual recibirá el eyaculado, este último se protege

dentro de un envase plástico que contiene agua a 37 °C, a fin de evitar cambios de temperatura (choque térmico)(Hidalgo, et al2005).



Figura 16. Vagina artificial para bovinos, Fuente Autor

El otro extremo de la vagina artificial se lubrica ligeramente, utilizando lubricante no espermicida, siendo este el extremo por donde penetrará el pene, durante el proceso de recolección. Vera Muñoz, O. 2001).

La recolección de una buena muestra requiere de la estimulación previa del semental, para ello se recomienda una secuencia de falsas montas y períodos de restricción, antes de recolectar cada eyaculado. La falsa monta consiste en estimular al animal permitiendo la erección y el intento de monta para luego desviar el pene manteniendo el glande al aire e impidiendo todo contacto con la monta. Una vez que se considere el animal adecuadamente estimulado, se procede a la recolección del eyaculado por medio de la vagina artificial. Para proceder a la recolección del eyaculado con el animal y la vagina artificial, previamente preparados, un operador diestro se coloca del lado derecho del toro, al momento del intento de monta desvía el pene tomando prepucio con la mano izquierda hacia el lado derecho impidiendo todo contacto con la monta. Con la mano derecha, sosteniendo la vagina artificial, se coloca el extremo lubricado por delante del pene, y como respuesta al estímulo (presión y temperatura) semejante a la vagina de la vaca en celo, el toro penetra la vagina en toda su extensión, realizando lo que se conoce como golpe de riñón. La eyaculación del bovino se considera monofásica y sumamente violenta

(segundos), después de la eyaculación el animal desmonta casi inmediatamente, entonces, se procede a retirar el tubo graduado (conteniendo el eyaculado), protegiéndolo debidamente de la luz solar directa, cambios drásticos de temperatura (choque térmico) y contaminación, se identifica la muestra y se entrega en el laboratorio para su procesamiento inmediato.

Con la utilización del electroeyaculador, como método para la recolección de semen, la eyaculación es un proceso bifásico, primero ocurre la emisión y continúa con la erección y la eyaculación propiamente dicha. Cuando se produce la estimulación adecuada, esta viaja vía nervio pudendo interno hacia los centros lumbosacros de la columna vertebral, desde allí parte la respuesta vía nervios simpáticos lumbares (nervio erigente del plexus hipogástrico), lo cual estimula la contracción de la musculatura lisa que recubre la próstata, glándulas vesiculares y conductos deferentes, asegurando la progresión de la masa espermática hacia la uretra pélvica (emisión). Por otro parte, la respuesta nerviosa viaja vía nervios parasimpático para provocar la contracción de la musculatura estriada del tracto uretral (músculo isquiocavernoso, bulboesponjoso y uretral), lo cual que resulta en la erección del pene y la eyaculación propiamente dicha. (Vera Muñoz, O. 2001).



Figura 17. Electroeyaculador. Fuente: Autor

Antes de la utilización del electroeyaculador se procede a la preparación del animal, lo cual incluye: recortar los pelos del orificio prepucial y limpiar el exceso de sucio (bosta y barro), si es necesario se debe lavar y secar cuidadosamente el área. Como pasante, una de las funciones era el de limpiar el recto y a estimular mediante masaje transrectal estimulando las glándulas accesorias (glándulas vesiculares y ampollas de los conductos deferentes) y, posteriormente, se introduce el electrodo adecuado. Se inician los estímulos a mínima intensidad y rítmicamente se incrementa, de acuerdo con la reacción del animal, cada estímulo debe durar menos de un segundo y se deben aplicar entre cinco y 10 estímulos por cada grado de intensidad. Las reacciones son muy variables entre animales y aun en el mismo animal.

En otras oportunidades, se me permitió actuar como recolector, para esto debía ser capaz de reconocer la fracción pre espermático y sólo recolectar la segunda fracción rica en espermatozoide. Para la recolección del eyaculado se utiliza un aparato, el cual consiste en un aro de plástico con mango que sostiene un embudo de látex o plástico y un tubo graduado para la recolección del eyaculado, este último se protege con un envase plástico. (Sport, L;et al. 2009).

2.2.1.3. Evaluación de semen. Para considerar a un toro como apto desde el punto de vista reproductivo, asumiendo que es un animal clínicamente sano, este debe cumplir con tres requisitos básicos: buena libido, buen estado clínico reproductivo y buena calidad espermática. La evaluación del semen es un elemento importante para la certificación de la aptitud reproductiva en un toro. Una vez que el semen recolectado llega al laboratorio, este se debe colocar en baño María, a una temperatura de 37 °C para comenzar con su evaluación. Eran funciones del pasante asistir al profesional o realizar el procedimiento bajo su supervisión.

2.2.1.3.1. Evaluación macroscópica. La evaluación macroscópica del semen debe incluir los parámetros siguientes:

- a. **Volumen:** primero se registra el volumen contenido en el tubo graduado de recolección, luego con el uso de una pipeta graduada se aspira toda la muestra y se registra su volumen. En cuanto al volumen existen algunos valores de referencia, tanto para el semen obtenido con vagina artificial como para las recolecciones con electroeyaculador. (Hidalgo, C; Tamargo, et al C. 2005)
- b. **Color:** generalmente el semen es de color blanco y la densidad de la muestra estará en relación directa con la concentración de espermatozoides. Las muestras más densas serán de color y aspecto más cremoso, mientras que las más diluidas, serán de aspecto lechoso y hasta completamente claro y transparente, como es el caso de aquellos animales con oligospermia o azoospermia.

En algunos toros se puede observar eyaculados de color amarillento; esto se corresponde con un pigmento llamado riboflavina que se produce en las glándulas seminales y que es inocuo. También se puede observar una coloración rojiza, la cual indica la presencia de sangre fresca, mientras que un color pardo señala la presencia de sangre más vieja (hemolizada), denominándose ambos tipos como hemospermia. Una coloración gris indica suciedad. Los eyaculados con muy pocos espermatozoides tienen una coloración amarillo-verdosa. El material purulento en el eyaculado se reconoce frecuentemente por los folículos (piospermia). (Vera Muñoz, O. 2001).

Tabla 8. Relación entre el color del semen recolectado y su concentración en número de espermatozoides por milímetros cubico

Color	N° de Espermatozoides
Blanco cremoso	≥ 1000000 esp/ml
Blanco lechoso	800.000 - 600.000 esp/ml
Blanco acuoso	< 50.000 esp/ ml

Fuente: Rosemberger, 1981

- c. Olor:** las muestras de semen recogidas higiénicamente de toros sanos y fértiles tienen un olor catalogado como sui géneris, es decir, un débil olor aromático como a yema de huevo. Son motivo de rechazo un olor urinoso o pútrido, el cual se produce luego de contaminación, por ejemplo: materia fecal.
- d. Aspecto:** se entiende por aspecto del semen a la presentación luego de su colección, este puede ser: limpio, homogéneo, grumoso, sucio. El aspecto del semen va a depender del número de espermatozoides por milímetros cúbicos, a los componentes de secreción de las glándulas accesorias y eventuales agregados, como: sangre, pus, células epiteliales y suciedad.

Una vez analizados estos factores, la información era consignada en registro; esta era otra de las funciones realizadas como pasante.

2.2.1.3.2. Densidad macroscópica. Esta evaluación se llevaba a cabo por el pasante; Para la densidad macroscópica se ha establecido un criterio basado en intervalos de concentración espermáticos, dependiendo de la opacidad de las muestras, lo cual indica una mayor o menos concentración espermática.

En la tabla 9 se indica la densidad macroscópica en base al número de espermatozoides por mililitro (concentración).

La evaluación microscópica debe incluir los elementos siguientes:

- a. Motilidad masal:** la evaluación de la motilidad masal indica la capacidad de movimiento de los espermatozoides en el eyaculado como un todo. En el caso del toro, por ser un eyaculado, generalmente, muy concentrado se puede realizar este procedimiento. (Catena, M; Cabodevila, J. 1999)

Para evaluar la motilidad masal se toma una gota de semen con una pipeta (una gota de semen entero es de 10 a 20 microlitro - ul), se coloca sobre un portaobjeto a 37 °C y se observa sin necesidad de cubreobjetos, en campo claro a un aumento de 100X del microscopio.

El movimiento en masa dependerá de tres factores: concentración espermática, porcentaje de espermatozoides móviles en progresión lineal y velocidad de progresión de los espermatozoides

Tabla 9. Densidad macroscópica con base en el número de espermatozoides por mililitro

Densidad macroscópica	N° de espermatozoides
Azoospermico	0 espermatozoides en el eyaculado
Oligospermico	Menor de 200 mill epz/ml
Ralo	200-500 mill epz/ml
Semidenso	500-800mill. Ep z /ml
Denso	800-1500 mill epz7ml
Densísimo	Mayor de 1500 mill. Epz/ml

Fuente: Rosemberger, 1981

- b. Motilidad individual:** la motilidad individual en una muestra de semen se expresa como el porcentaje (%) de células móviles bajo un campo microscópico. Un espermatozoide de motilidad progresiva es aquel que se mueve de un punto a otro en una línea más o menos recta. Gran parte de los espermatozoides podrán tener otros tipos de motilidad; esto incluye movimientos circulares, así como inversos, debido a

anormalidades en la cola y a un movimiento de vibración o de oscilación, asociado a menudo al envejecimiento.(Kastelic JP, et al 2011).

El examen de la motilidad individual se debe hacer con la ayuda de un microscopio de contraste de fases, una temperatura de 37 °C, la cual se puede mantener constante con una platina calentadora termo regulable adherido al microscopio. Esta valoración es cuanti-cualitativa, ya que se evalúa la tasa de espermatozoides en movimiento de 0 a 100% y la calidad, según el tipo de movimiento (progresión lineal, progresión no lineal, no progresivo e inmóviles).

El semen de toro es demasiado concentrado como para hacer una determinación exacta de la motilidad individual, sin diluir el semen. Un volumen pequeño de la muestra se debe diluir con una solución isotónica (con la misma concentración de iones libres que en el semen), para poder observar individualmente a los espermatozoides. Se utiliza cloruro de sodio a 0,9% o citrato de sodio a 2,9%. Luego se coloca una gota diluida (10 a 12 micro litros - ul) en un portaobjeto y se cubre para observar al microscopio. En toros esto requiere de una dilución de uno en 100 (Rosemberger, G. 1981.)

Tabla 10. Clasificación de la motilidad individual en eyaculados bovinos

Descripción	Valor	Clasificación
1	Excelente	>70%
2	Bueno	50 – 70%
3	Regular	30-50%
4	Malo	<30%

Fuente: Rosemberger. 1981

- c. **Vitalidad:** existe un conjunto de técnicas que permiten una coloración selectiva entre espermatozoides vivos y muertos, esto como consecuencia de los cambios bioquímicos que se producen tras la muerte del espermatozoide (acción cromacitológica). La técnica se realiza extrayendo una gota, de aproximadamente 10 microlitos (μ l) de semen puro y colocándola sobre la punta de un portaobjetos limpio y desengrasado, previamente atemperado a 36-37 °C sobre la platina

térmica. Sobre esta gota se coloca una gota de aproximadamente 30 microlitos (μl) del colorante vital eosina, el cual debe estar a la misma temperatura del semen en un tubo de ensayo dentro de un baño María. Se mezcla semen y colorante suavemente, con la punta de la pipeta por aproximadamente 20 segundos. Luego con otro portaobjetos, también atemperado, se apoya sobre el borde de la gota para que por capilaridad se distribuya sobre el portaobjetos, luego se levanta y se realiza el extendido en forma firme. Se deja secar sobre la platina térmica y se procede a su lectura.

El fundamento de esta técnica es el siguiente: el colorante penetra la membrana de los espermatozoides muertos, dejando sin teñir los que se encontraban vivos al momento de realizar la tinción. Para sacar el porcentaje de espermatozoides vivos se procede a observar el frotis a 100 aumentos, contando en guarda griega todos los espermatozoides de cada campo evaluado, discriminando los que están teñidos, como muertos, y los sin teñir, como vivos. (Vera Muñoz, O. 2001).

Se cuentan no menos de 100 células y se saca el porcentaje. Se considera como valor mínimo aceptable 70% de espermatozoides vivos. Otros sustitutos eficaces de la eosina como colorante vital son el rosa de bengala, la eritrosina, el verde cresol o el azul de bromo fenol con el que se ha tenido más claridad en la interpretación; mientras que, en todo caso, como colorantes de fondo se prefiere el azul de anilina o la nigrosina. Con el colorante eosina nigrosina los espermatozoides muertos aparecen teñido en rojo o en rosa, mientras que los vivos quedan sin teñir



Figura 18. Tinción eosina- nigrosina. Fuente: autor

Morfología del espermatozoide: el sistema de clasificación que ha sido aceptado ampliamente en bovinos es el de las atipias o defectos espermáticos primarios y secundarios. Por definición, un defecto primario es el que se origina dentro del testículo durante la espermatogénesis, mientras que un defecto secundario es el que se origina dentro del epidídimo.



Figura 19. Vitalidad espermática. Fuente: autor

Se ha demostrado la correlación entre defectos morfológicos del espermatozoide e infertilidad y se ha establecido 30% como un porcentaje aceptable o máximo permitido de atipias, es decir, se acepta 70% de espermatozoides normales. Se ha establecido un límite de defectos de la

cabeza de 15 a 20%, mientras que defectos del acrosoma y defectos de la cola se toleran en 25%

Se han desarrollado muchos métodos o pruebas para valorar la morfología espermática, las cuales se pueden conseguir con coloraciones sencillas, como la eosina-nigrosina-giemsa fácil de realizar cuando se evalúa un semen tal a campo (Vera, O; Bastidas, P. 1999).

e. Concentración espermática: a concentración de espermatozoides se expresa como el número de espermatozoides por ml.

La determinación de la concentración zoospérmica se lleva a cabo en forma simple mediante métodos semejantes al recuento de glóbulos rojos realizado en hematología. En el laboratorio de biotecnología del politécnico Jaime Isaza Cadavid se usa el espectrofotómetro (espermecue- minitube)

Espectrómetro: Produce un rango deseado de longitud de onda de luz. Primero un colimador (lente) transmite un haz recto de luz (fotones) que pasa a través de un monocromador (prisma) para dividirlo en varias componentes de longitudes de onda (espectro). Entonces un selector de longitud de onda (ranura) transmite sólo las longitudes de onda deseadas.



Figura 20. Espectrofotómetro. Fuente: Autor

El recuento directo de células espermáticas se realiza utilizando el hemocitometro. El hemocitometro (Cámara de Neubauer) fue diseñado para contar eritrocitos, la cual consiste en una lámina especial que tiene dos cámaras de conteo

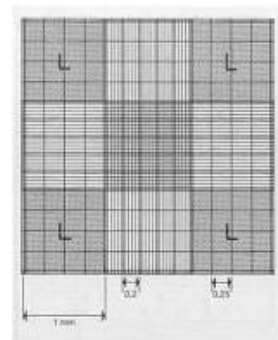
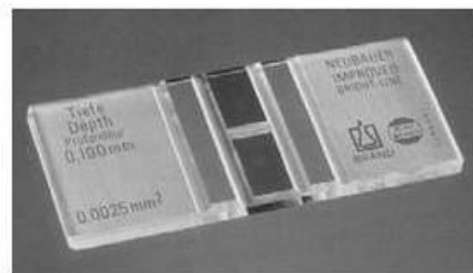


Figura 21. Cámara de Neubauer

Las cámaras de conteo tienen 0,1 milímetro de profundidad y un área graduada en el fondo de la cámara de un milímetro al cuadrado. Esta cuadrícula central se divide en 25 cuadros más pequeños. Al conocerse la profundidad y el área es posible determinar el número de espermatozoides en un volumen dado

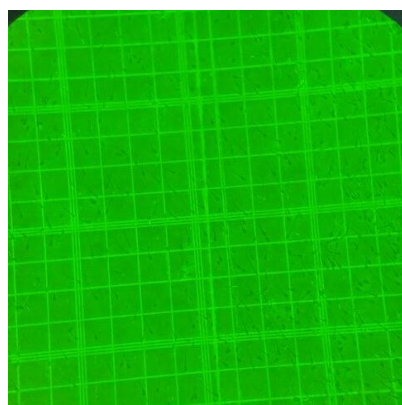


Imagen 22. Conteo cámara de Neubauer. Fuente: autor

Por lo general, se utiliza un factor de dilución de 1 en 200 en el caso del semen del toro, la solución utilizada para diluir el semen debe inmovilizar a los espermatozoides de tal manera que se pueda llevar a cabo el recuento; normalmente se utiliza una solución de cloruro de sodio a 3% (solución hipertónica) o solución salina formulada al tres por mil. De esa dilución se toman unos 20 microlitos (ul) y se depositan en el hemocito metro. (Vera Muñoz, O. 2001).

Para el cálculo de la concentración espermática se cuenta el número de espermatozoides en cinco de los 25 cuadros de la cuadrícula central (las cuatro esquinas y el centro). Este resultado se multiplica por cinco que representa los cinco cuadros, por 200 que representa la dilución y por 10 que representa la altura de la cámara. De esa forma se obtiene el número de espermatozoides por milímetros cúbicos. El resultado se multiplica por 1.000 y se transforma en una medida volumétrica, entonces, la concentración queda expresada en cantidad de espermatozoides por mililitro.

f. Características fisicoquímicas: el test de pH, generalmente, se incluye en los análisis de rutina como un parámetro orientador.

El pH viene dado por el resultado de las secreciones Ácidas provenientes de la próstata y las secreciones alcalinas de las vesículas seminales. El pH en el semen del toro oscila entre 6,6 y 6,9 hasta 7 como valor normal. Si el pH excede de 7 se puede sospechar de algún tipo de infección y probablemente, en ese caso, disminuya la secreción de productos ácidos de la próstata, como el ácido cítrico. Se pueden registrar también valores de pH anormales en el caso de eyaculación incompleta. (Kastelic JP, et al 2011).

Valores de pH extremadamente ácidos (>6,5) se encuentran en casos de agénesis o oclusión de las glándulas vesiculares. El pH se mide con un papel indicador, el cual se coloca en el semen sin diluir inmediatamente después de su recolección y enseguida después de diluir la muestra, para ello se deja caer una gota del semen mediante una pipeta capilar sobre el papel indicador y el reverso humedecido de este se compara inmediatamente con la escala de color de pH. (Vera Muñoz, O. 2001).

Enfriamiento progresivo: consiste en bajar la temperatura del semen diluido de 37 °C a 5 °C, este proceso debe ser controlado periódicamente de manera que la disminución de la temperatura sea de forma lenta y gradual, durante aproximadamente 45 a 60 minutos para evitar los daños causados por el choque térmico.

Equilibración (estabilización): proceso que consiste en mantener a 5 °C por un período de tres a seis horas para acondicionar los espermatozoides a la congelación posterior, durante este período se procede a efectuar la identificación, llenado y sellado de las pajuelas.

Congelación horizontal: consiste en realizar la congelación de las pajuelas de semen colocadas en la rampa de congelación en los vapores del nitrógeno líquido, por un tiempo de 10 minutos. A una temperatura aproximada de 110 °C.

Almacenamiento temporal: las pajuelas permanecen en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C, hasta realizar el examen microscópico a las 24 horas y a los 15 días pos congelación para verificar la motilidad individual.

Almacenamiento definitivo: las pajuelas permanecen en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C, si reúnen buenas características de supervivencia espermática (motilidad individual pos congelación).

3. DISCUSIÓN DE CASO – TRABAJO DE CAMPO, PROCESO DE FERTILIZACIÓN IN VITRO, FINCA EL LIMONAR

En el presente capítulo se muestra el trabajo de fertilización in vitro realizado en la finca “El Limonar”. Se darán a conocer los datos obtenidos en este proceso el cual incluyó la sincronización de Receptoras, Fertilización In Vitro en laboratorio y acompañamiento en la transferencia a receptoras; todas estas actividades estuvieron a mi cargo como Pasante.

3.1. UBICACIÓN. La finca el Limonar se encuentra ubicada en el Municipio de Girardota en el departamento de Antioquia; La cabecera municipal cuenta con una temperatura de 22 °C y una altura 1425 msnm. El municipio de Girardota se encuentra localizado al norte del Valle de Aburrá, cuenta con un área de 82 km² y hace parte del área metropolitana de la ciudad de Medellín.

3.2. SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS. En un proceso de FIV donde se proyecta a realizar transferencia de embriones en fresco, se debe siempre iniciar con la sincronización de las receptoras; es por esto que en el proceso de FIV de la Finca El Limonar se inició con la evaluación de 17 receptoras (9 de la raza holstein, 6 jersey, 1 jerhol y 1 simmental); a estos animales se les realizo palpación rectal con el objetivo de evaluar las estructuras internas, realizando una evaluación de útero y óvulos; de las 17 vacas palpadas se sincronizaron 16, esto debido a que una vaca no fue apta por presentar ovarios lisos (Tabla 11), dejando solo las vacas que presentaban ovarios con presencia de folículos o cuerpos lúteos, es decir aquellas hembras con actividad ovárica. Las receptoras aptas se sincronizaron según protocolo del laboratorio de

biotecnología animal del Politécnico Jaime Isaza Cadavid, en el cual para el día 0 se colocó DIB más 2 ml de benzoato de estradiol; día 8 se removió el DIB y se aplicó 3ml Cloprostenol® + 2ml Novornon® + 1ml Cypiosin®; *al otro día de retirado el implante se realizó la aspiración folicular de las hembras donadoras*, esto con el objetivo de que a los 7 días de aspirado y retirado el implante la edad del embrión y del cuerpo lúteo coincidan, permitiendo una mejor implantación.

Tabla 11. Receptoras valoradas por palpación rectal.

	No	HORA	RAZA	ESTADO	OVARIOS	APTA
1	23	9:52 AM	Simmental	VACIA	FLI-FLD	SI
2	28	9:59 AM	Holstein	VACIA	FLD-CLI	SI
3	32	10:08 AM	Jerhol	VACIA	FLD –CLI	SI
4	37	10-31 AM	Jersey	VACIA	CLD	SI
5	423	11:17 AM	Jersey	VACIA	CLD	SI
6	408	11:24 AM	Jersey	VACIA	CLD	SI
7	95	11:29 AM	Jersey	VACIA	FLD-CLI	SI
8	MAGALY	11:31 AM	Holstein	VACIA	CLD	SI
9	94	11:42 AM	Holstein	VACIA	CLD	SI
10	48	11;47 AM	Holstein	VACIA	CLD	SI
11	462	11:56 AM	Holstein	VACIA	LISOS	NO
12	482	12:04 M	Holstein	VACIA	MULTIFOLICULAR	SI
13	450	12:07 M	Jersey	VACIA	CLD –OIL	SI
14	468	12:10 M	Holstein	VACIA	FLD- OIL	SI
15	448	12:16 M	Holstein	VACIA	CLD	SI
16	466	12:20 M	Jersey	VACIA	FLI	SI
17	447	12;27M	Holstein	VACIA	FLD	SI

Fuente: Autor

3.3. ASPIRACIÓN FOLICULAR. Como ya se mencionó, en los procesos de aspiración la actividad como pasante era de acompañamiento, ya que quien realizaba el proceso de aspiración era el Profesional Jaime Galindo (MVZ).

Para la aspiración folicular, se realizó una palpación de inspección y luego se colocó el transductor pegado al ovario a aspirar en posición cráneo dorsal, a la izquierda o derecha de la abertura externa del cérvix dependiendo del ovario que era aspirado; el producto de la aspiración se recolecto en tubos cónicos de 50ml con una solución que contenía una dilución del 1% de suero fetal bovino, 5 ml de solución salina; 0.5ml de antibiótico por cada 500 ml de solución salina y heparina de 0.1—0.3ml por cada tubo cónico de 50 ml. En total se aspiraron 6 vacas donadoras; 5 de raza jersey y 1 simmental. Una vez realizado la correcta aspiración, el producto contenido en el tubo cónico se pasó al técnico que realiza la búsqueda, selección y clasificación de los oocitos, teniendo en cuenta los criterios de clasificación explicados en el capítulo anterior; la búsqueda se realizó en un estereoscopio de luz indirecta, dejando siempre el producto aspirado sobre la placa térmica a una temperatura 38°C, se aclara que en campo se realizó el filtrado en el filtro de cultivo celular y luego los oocitos se pasaron con la ayuda de una pipeta Pasteur a la segunda caja de Petri; concluido esto, los oocitos se buscaron y clasificaron en el estereoscopio para finalmente ser enviados al laboratorio de Politécnico en un medio de maduración (TCM 199 + FSH + LH + Rojo fenol + amikacina), donde se completó la maduración de los oocitos (24horas).



Figura 23. Proceso de aspiración folicular en las Donadoras. Fuente: Autor

En la tabla 12, se presentan los resultados de las donadoras aspiradas, especificando número de oocitos obtenidos por animal, con su respectiva

clasificación; en dicha tabla se observa que los oocitos obtenidos fueron de clasificación 2 y 3, y no se obtuvieron de clasificación 1.

Tabla 12. Aspiración folicular, selección y clasificación de oocitos finca El Limonar.

N°	Donadora	Raza	Clasificación de oocitos					Total	Viables
			Grado 1	Grado 2	Grado 3	Degenerados	Atresicos		
1	244	Jersey	-	1	12	3	1	17	13
2	250	Jersey	-	2	8	1	4	15	10
3	264	Jersey	-	2	15	2	4	23	17
4	246	Jersey	-	1	6	2	1	10	7
5	Paquita	Jersey	-	2	5	2	3	12	7
6	Juliana	Simmental	-	2	10	-	8	20	12
Total			-	10	56	10	21	97	66

Fuente: Autor

En total se recolectaron 97 oocitos, de los cuales se obtuvo un 68,04% de oocitos viables (66 oocitos, 10 grado 2 y 56 en grado 3) y un 31,95% entre embriones degenerados y atresicos, siendo de 10,3% y 21,64% respectivamente (Tabla12 y Figura 24); estos resultados coinciden con lo reportado por Crespo y Guaman en 2015, quienes obtuvieron en la aspiración folicular un 37,34% de oocitos degenerados y 62,66% de oocitos viables.

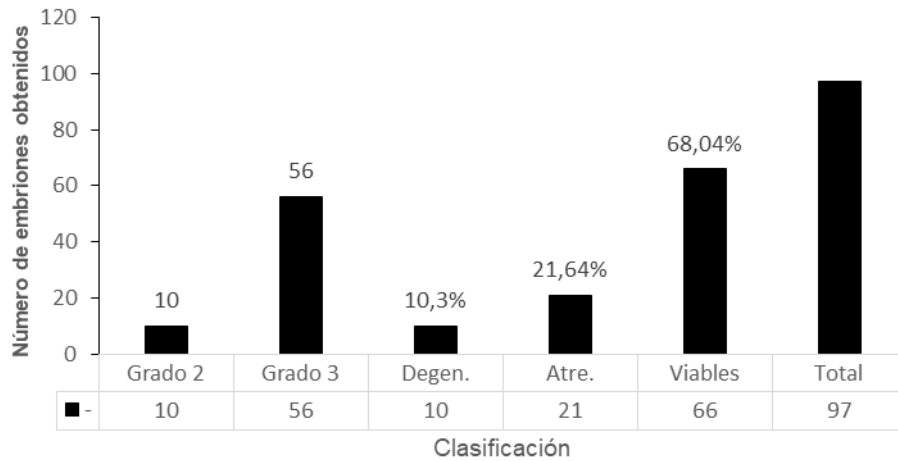


Figura 24. Clasificación de embriones obtenidos en la Finca el Limonar.



Figura 25. Selección y clasificación de oocitos. Fuente: Autor

3.4. PROCESO DE MADURACIÓN. El tiempo de maduración (24 horas) se inició a contar desde que los oocitos se introdujeron en el medio ya mencionado; para este caso los oocitos duraron en transporte aproximadamente 1 horas, luego se colocaron en una incubadora hasta completar las 24 horas, en la incubadora se manejó una temperatura promedio de 38°C y dos gases (CO₂ y O₂; al 5% cada uno).

Tabla 13. Proceso de maduración de oocitos, finca El Limonar.

Donadora	Oocitos viable	Maduros	No maduros	% de maduración
1	13	12	1	92,3
2	10	9	1	90
3	17	16	1	94,1
4	7	7	0	100
5	7	6	1	85,7
6	12	12	0	100
Total	66	62	4	93,9

Fuente: Autor

En la tabla13 se observa un promedio de maduración del 93,9%; en el 2015, Crespo y Guaman trabajando los mismos tiempos de maduración, medios de cultivo y concentración de gases, lograron una maduración de 74,17% con expansión de las células del cumulus. Baez *et al.* en 2010 reporta un 66,17% y 50,94% de maduración en Indicus y Taurus, respectivamente; y Urrego *et al.* en 2008 encontró una maduración del 78,8%.

3.5. FERTILIZACIÓN Y CLIVAJE EMBRIONARIA. Siguiendo el protocolo manejado por el laboratorio de biotecnología animal del Politécnico Jaime Isaza Cadavid se realizó el proceso de fertilización, el cual consistió en colocar microgotas de 30 micras de SOFT en aceite mineral en una caja de Petri; en estas se colocaron los oocitos y luego los espermatozoides ya capacitados; posterior a esto se hacen la previsión la cual coincidió con la feeding. En la tabla 14, se observa que se obtuvieron 62 embriones, de los cuales el 40,3% no presentaron clivaje (25) y el 59,67% clivaron (37), del total de estructuras que clivaron solo 16 resultaron en embriones transferibles. Según lo reportado por Crespo y Guaman en 2015, luego del cultivo en medio SOF se alcanzó un

60,2% de oocitos con división celular y un 39,8% presento apoptosis. En cuanto a la fertilización, Fernandez *et al.* 2007, reporta un 73,3% de fertilización.

Tabla 14. Clivaje de Embriones, Finca El Limonar.

Donadora	No Clivaron	Clivaje	Transferibles	Estructuras Totales
1	7	5	2	12
2	2	7	4	9
3	9	7	2	16
4	2	5	4	7
5	1	5	-	6
6	4	8	4	12
Total	25	37	16	62

Fuente: Autor

3.6. EMBRIONES TRANSFERIDOS A RECEPTORAS. Luego de la fertilización, se avaluó la calidad del embrión, clasificándolos según sus estructuras en morula, blastocisto y blastocisto expandido. De las 16 estructuras transferibles, 15 fueron transferidos en fresco a receptoras aptas luego del proceso de sincronización (Tabla 15) y uno (1) fue vitrificado. En cuanto a los estados embrionarios de los embriones transferidos en fresco, se obtuvieron 8 blastocistos, 5 blastocistos extendidos y dos mórulas (Tabla 15).

Tabla 15. Transferencia de embriones Finca El Limonar.

N°	Donadora	Raza	Toro	Raza	Embri*	Receptora	Ovario**
1	244	Jersey	Hilario	Jersey	BL	37	I3
2	250	Jersey	Hilario	Jersey	BL	32	I3
3	250	Jersey	Hilario	Jersey	Mo*	28	D3
4	250	Jersey	Hilario	Jersey	BL	94	D1
5	264	Jersey	Hilario	Jersey	BL	406	I3
6	246	Jersey	Hilario	Jersey	BL	408	D2
7	246	Jersey	Hilario	Jersey	BL	423	I3
8	246	Jersey	Hilario	Jersey	BL	450	D1
9	Paquita	Jersey	Hilario	Jersey	Bx	95	D3
10	Paquita	Jersey	Hilario	Jersey	Bx	48	D2
11	Juliana	Jersey	Hilario	Jersey	BX	23	D2
12	Juliana	Simmental	Ozon	Simmental	Bx	482	I2
13	Juliana	Simmental	Ozon	Simmental	Bx	448	D2
14	Juliana	Simmental	Ozon	Simmental	BL	447	D3
15	Juliana	Simmental	Ozon	Simmental	Mo	468	D1

* Mo, mórula; BL, blastocitos; Bx, blastocitos expandidos. ** I, ovario izquierdo; D, Ovario derecho; 1 o 2 o 3, estado del cuerpo lúteo.

Fuente: Autor

Tabla 16. Vacas confirmadas de 90 días transferencia de embriones.

No.	Donadora	Receptora	Toro	Estado
1	244	37	Hilario	90 días
2	250	28	Hilario	90 días
3	408	246	Hilario	90 días
4	450	246	Hilario	90 días
5	Paquita	95	Hilario	Aborto

Finalmente de las 15 vacas transferidas, 5 quedaron preñadas, obteniéndose así un 33,3% de preñeces; sin embargo, se presentó un aborto, aunque este evento es independiente a FIV y su transferencia.

Según Lonergan, P *et al*, en el 2003; en los procesos de Fertilización *in vitro*; luego de la maduración *in vitro*, aproximadamente el 90% de los oocitos inmaduros cultivados, alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16-24 horas de comenzar la maduración. Alrededor del 80% de estos, es fecundado y comienzan a dividirse, al menos, hasta el estadio de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanza el estadio de blastocisto o blastocisto expandido luego del cultivo durante 6-7 días. Esto indica que el cultivo embrionario, correspondiente al paso más comprometido dentro del proceso de producción *in vitro*, donde existe los mayores porcentajes de pérdidas del sistema. A su vez, durante esta etapa, se define en gran medida la calidad de los embriones obtenidos.

4. CONCLUSIONES

La estancia en el laboratorio Biotecnología animal del Politécnico Jaime Isaza Cadavid permitió adquirir destreza en algunas técnicas o procesos que se desarrollaron durante la realización de los estudios de pregrado en la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. No obstante, el laboratorio de Biotecnología animal del Politécnico Jaime Isaza Cadavid, permitió adquirir nuevos y relevantes conocimientos en lo que respecta a la Biotecnología de la Fertilización in vitro y los procesos de andrología, y con esto obtener una mayor formación en el campo de la biotecnología animal con el aporte destacado de los profesionales que tiene el Politécnico Colombiano en su laboratorio de biotecnología animal.

A pesar de los conceptos adquiridos en la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, solamente cuando se está en la parte práctica es cuando se valora realmente la calidad de nuestro Docentes de la UPTC; adicional a lo anterior la práctica realizada en cada actividad permite el adquirir destrezas en el área de la biotecnología reproductiva.

En el trabajo realizado en la finca el Limonar, se evidencio que los resultados obtenidos en el laboratorio de biotecnología animal están acordes a lo reportado en la literatura. En donde de los 97 oocitos recolectados se obtuvo un 68,04% de oocitos viables, correspondientes a 66 oocitos (10 grados 2 y 56 grado 3) y un 31,95% entre embriones degenerados y atresicos. De los oocitos viables se logró una maduración del 93,9%. Y luego de la fertilización el 40,3% no presentaron clivaje (25 de 62) y el 59,67% de los embriones presentaron clivaje (37 de 62 oocitos). Finalmente, de este proceso 5 receptoras fueron confirmadas como preñadas, lo cual corresponde a un porcentaje del 33,3%. Indicando estos resultados que la biotecnología reproductiva en Colombia responde a las exigencias técnicas de sus procesos.

5. RECOMENDACIONES

5.1 AL LABORATORIO ANIMAL DEL POLITECNICO COLOMBIANO JAIME ISAZA CADAVID.

- Continuar en el proceso de capacitación de pasantes y profesionales, ya que es por medio de la práctica donde se construyen las destrezas necesarias para enfrentar la vida profesional.

5.2A LA UNIVERSIDAD Y AL PROGRAMA.

- Mantener la calidad del programa por medio de la vinculación de Docentes de excelente calidad.
- Ampliar el servicio del laboratorio de reproducción animal de la universidad, con el objetivo de ofrecer los servicios de aspiración folicular y FIV; esto teniendo en cuenta que se cuenta con el talento humano necesario y con algunos equipos, sin embargo, es necesario la adquisición de equipos faltantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avery, B., Greve, T. 1995. Impact of percollâ on bovine spermatozoa usedfor in vitro insemination. *Theriogenology*. Vol. 44, pp.871-878.

Ball GD, Coulan CB, FieldCS, Harms RW, Thie JT, Byers AP. 1985. Effects of serumsource on human fertilization and embryonic growth parameters *in vitro*. *Fertil Steril*. 44:75-79.

Bavister BD. 1992. Co-culture forembryo development: is it really necessary? *Human Reproduction*: 10:1339-1341.

Brackett, B. D., Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod*. Vol. 12, pp. 260-274.

Báez Contreras, Francisco J, Chávez Corona, Adeymi C, Hernández Fonseca, Hugo J, & Villamediana Monreal, Patricia C. 2010. Evaluation of in vitro development capacity of bovine oocytes obtained from predominantly *Bos taurus* and *Bos indicus* cows. *Revista Científica*, 20(3), 259-267. Recuperado, febrero de 2018, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300007&lng=es&tlng=en

Cabodevila J., Teruel M,. 2001. Criopreservación de embriones bovinos. En: *Biotechnología de la reproducción*. (ed.) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Argentina, pp. 149-174

Cabrera P., Fernández A. 2006. Criopreservación de Embriones: una herramienta básica en la Reproducción Asistida. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinaria Central de Venezuela* 2009. Venezuela. Publicado en Crio protectores. Publicado en internet, disponible en *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. Universidad Central de Venezuela.

Catena, M; Cabodevila, J. 1999. Evaluación del semen bovino.Simposio Internacional de Reproduccion Bovina (UNCPBA).Tandil. *Taurus*. 1(3):18-31. Recuperado, febrero de 2018, de http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762006000200001&lng=es&nrm=iso Activo agosto 2009

Colenbrander, B.; Gadella, B.; Stout, T. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of the stallion fertility. *Reprod. Dom. Anim.* 38(4):305-311.

Crespo J.L y Guamán E. G. 2015. Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano utilizando el protocolo de Genes Difusión. Tesis de pregrado en Ingeniería Agronómica. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.

Cruz P, Medina V, Robles, Velasco Y. 2006 Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Bryconamazonicus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 2006; 19(2):153-159.

Eagle H. 1959. Amino acid metabolism in mammalian cells. *Science* 130:432-437.

FAO. 2012. Ganadería Mundial 2011. La ganadería en la seguridad alimentaria (en línea). Roma, FAO. Recuperado, febrero de 2018; Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/016/i2373s/i2373s00.pdf>

Fernández, Adriana, Díaz, Thaís, & Muñoz, Gladys. 2007. Producción In vitro de Embriones Bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 48(1), 51-60. Recuperado en 03 de febrero de 2018, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762007000100006&lng=es&tlng=es.

Fry, R. C., Niall, E. M., Simpson, T. L., Squires, T. J., Reynolds, J. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*. Vol. 47, pp. 977-987.

Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K., Toyoda, Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to blastocyst stage. *Biol. Reprod.* Vol. 42, pp. 114-119.

Gandolfi F, Brevini TA, Moor RM. 1989. Effect of oviduct environment on embryonic development. *J Reprod Fert.* 38:107-115.

Gardner, HG, Kaye PL. 1991. Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse pre-implantation embryos *in vitro*. *Reprod Fert Dev* 3:79-91.

Geshi, M., Takenouchi, N., Yameuchi, N., Nagai, T. 2000. Effect of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biology of reproduction*, 63: 1730-1734.

Gilardi SGT, Pinho TG, Martins CB. Perímetro escrotal características do sêmen de touros Nelore aos 18 meses de idade. *Rev Bras Cienc Vet*. 2001;8:13-15.

Gordon, I., y K.H. Lu. 1990. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33:77-87.

Graham, J.; Mocé, E. 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 64:492-504.

Gutierrez Adan A, Granados J, Pintado B y De laFuente J. 2001. Influence of the glucose on the sex ratio of bovine IVM-IVF embryos cultured *in vitro*. *Reprod. Fétil. & Develop.* 13, 361-365.

Hazeleger, N.L., D. J. Hill, R.B. Stubbings y J.S. Walton. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology*, 43:502-509.

Hidalgo, C; Tamargo, C; Diez, C. 2005. Análisis del semen bovino. Asturias, España. *Información ganadera*. 39 Boletín Informativo SERIDA. No. 2. p. 39-43

Hofig, A, Simmen FA, Simmen RCM. 1990. Effects of dihydroepiandrosterone (DHEA), insulin-like growth factor (IGF-1), Insulin (I) on estradiol production by porcine conceptuses *in vitro*. *Biol Reprod*. 42 (Suppl. 1), 135.

Hyttel, P., Xu, K. P., Smith, S., Greve, T. 1986. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.* Vol. 78, pp. 615-625. Recuperado, febrero de 2018, de

<http://www.monografias.com/trabajos903/vitrificacion-tecnica-crioconservacion/vitrificacion-tecnica-crioconservacion2.shtml>

Kastelic JP, Cook RB, Pierson RA, Coulter GH. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. *Can J Vet Res*. 2001;65(2):111-5.

Kane MT. 1988. The effects of water-soluble vitamins on the expansion of rabbit blastocysts *in vitro*. J Exp Zool. 245:220-223.

Keskintepe L, Clay A, Burnley y Brackett BG. 1995. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. Biol Reprod. 52:1410-1417.

Kim JH, Funahashi H, Niwa K, , Okuda K. 1993. Glucose requirement at different developmental stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. Theriogenology 37:875-886.

Kobayashi K, Satoh T, Yamashita, S, Hoshi, H. 1994. Low oxygen level and glucose improves the development of fertilized bovine oocytes in defined medium without somatic cells. *In vitro* cell Dev Biol. 30A:556-558.

Kruip Tham, boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM, mc Pieterse 1994 potential use of ovum pick-up for embryoproduction and breeding in cattle therionology 42,675-684.

Kuwayama, M.; Hamano, S.; Nagai, T. 1992. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod. Fert. 96:187-193

Lane M, Gardner DK. 1997. Mouse embryo development is differentially regulated by amino acids. J ReprodFertil 109:153-164.

Leese HJ. 1988. The formation and function of oviduct fluid. J ReprodFert. 82:843-856.

Leifried, L., First, N 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. J Anim. Sc 48:76-83.

Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., First, N. L. 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. Biol. Reprod. 35:850-857

Lehninger, AL. 1975. Biochemistry. Worth Publishers, New York.

Leoni, G.; Bogliolo, L.; Berlinguer, E; Rosati, L; Pintus, P P; Ledda, S.; Naitana, S. 2002. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on

post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos. *Cryobiology* 45:204-212.

Lessley, B. A., Garner, D. L. 1983. Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in percoll. *Gamete Res.* Vol. 7, pp. 49-65.

Lonergan, P., Rizos, D., Kanka, L., Nemcova, L., Mbaye, A.M., Kingston, M., Wade, M., Duffy, P., Boland, M. 2003. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction* 126,337-346.

Lonergan, P., Vergos, E., Kinis, A., Sharif, H., Gordon, I. 1991. The effect of recovery method on the type of bovine oocytes obtained for IVM. *Theriogenology*, 35:231.

Lonergan, P., Rizos, D., Kanka, L., Nemcova, L., Mbaye, A.M., Kingston, M., Wade, M., Duffy, P., Boland, M. 2003. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*

Lu, K. H., Gordon, I., Gallager, M., McGovern, H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.* Vol. 121, pp. 259-260.

Madan, M.L. 2005. Animal biotechnology: applications and economic implication in developing countries. *Revue Scientifique et Technique Office International Des Epizooties* 24(1): 123-139.

Marguant-Le Guenne B, Gerard M, Solari A y Thibault C. 1989. *In vitro* culture of bovine eggs fertilized either *in vivo* or *in vitro*. *Reprod Nutr Dev* 29:559-568.

Massip, A.; Van Der Zwalm, P; Ecotrs, E. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27:69-79

Morillo, M; Salazar, S; Castillo, E. 2012. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay, VE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 60 p. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

Niwa, K., Ohoda, O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*. Vol. 30, pp. 733-741.

Oyuela L.A. y Jimenez C, 2010. Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. Med. Vet. Zoot. 2010. 57:191-200

Página Web del Politécnico Colombiano JAIME ISAZA CADAVID. Recuperado, febrero de 2018, de <http://www.politecnicojic.edu.co/index.php/laboratorios-agrarias>.

Palasz AT, Tornesi MB, Archer J y Mapletoft RJ. 1995. Media alternatives for the collection, culture and freezing of mouse and cattle embryos. Theriogenology 44:705-714.

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Leibfried-Rutledge, M. L., Crister, E. S., Eyestone, W. H., First, N. L. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology. Vol. 25, pp. 591-600.

Pelaez, V.A 2011. Producción in vitro de embriones bovinos. Monografía Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ecuador.

Ral1, W E; Fahy, G. M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryo at -196°- C by vitrification. Nature 313:573- 575

Reyes, S. 1995. Fecundación in vitro: Una nueva reproducción. Revista de Extensión TecnoVet. 2 (1): 1-3.

Riddel KP, Stringfellow DA Gray BW, Riddel, JrMG. 1985. Effects of antibiotics on development capacity of bovine embryos. Bov Pract. 30:94.

Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ. 1992. The protective action of betaine on the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-culture *in vitro*. J ReprodFertil. 95:585-595.

Roberts, SJ. 1986. Veterinary obstetric and genital diseases (Theriogenology). 3 ed. Beltsville, EE UU. p. 488-513

Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B., Pertoft, H. 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. Reprod. Fertil. Dev. Vol. 9, pp. 297-308.

Rossi CR, Bridgman BS, y Kiesel GK. 1990. Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. *Am. J. Vet. Res.* 41:1680-1681.

Ruiz, J, Correa, JE, & Martínez, M. 2010. Vitrification of bovine oocytes and its use in the parthenogenetic development of embryos. *Archivos de medicina veterinaria*, 42(1), 79-83. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2010000100011>

Saha, S.; Otoi, T; Takagi, M.; Boediono, A.; Sumantri, C.; Suzuki, T 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalosa, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* 33:291-299.

Saito, N.; Imai, K.; Tomizawa, M. 1994. Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* 41:1053-1060.

Salisbury, GW; Van Demark, NL; Lodge, JR. 1982. *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos*. 2 ed. Zaragoza, España. Acribia. p. 419-565

Sanchez, R., Risopatron, J., Sepulveda, G., Peña, P., Miska, W. 1995. Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa effects of proteinase inhibitors. *Theriogenology*. Vol. 43, pp. 761-768.

Shamsuddin M. 1993. *In vitro* Fertilization In The Bovine. PhD Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Faculty of Veterinary Medicine.

Sport, L; Carpenter, B; Thrift, T. 2009. Evaluación de la capacidad reproductiva de sementales *Bos indicus* y sus cruces en diferentes épocas del año en Tuzantla, Michoacán. Tesina. Mexico. Universidad de Michoacana de san nicolas de Hidalgo. p. 49-70

Steeves TE, Gardner DK. 1999. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol Reprod* 61;731-740.

Stubbings, R. B., Wosik, G. P. 1991. Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for in vitro fertilization. *Theriogenology*. Vol. 35 pp. 276.

Takahashi Y, First NL. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos; influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37:963-978.

Tea, N. T., Jondet, M., Scholler, R. 1983. Procéde d'isilement des spermatozoides mobiles de sperme humain per la méthode de migrationsédimentation. Pathol. Biol. Vol. 31, pp. 688-690.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson, LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep andcattle ova. J ReprodFert; 30:493-497.

Urrego R., Tarazona A., Olivera M., Camargo, O. 2008. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. Rev Colomb Cienc Pecu; 21:398-405

Utsumi K., Kato, H., Iritani, A. 1981. Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. Theriogenology. Vol. 35, pp. 695-703. UTSUMI, K. L.

Vajta, G.; Holm, P; Kuwayama, M.; Booth, P J.; Jacobsen, H.; Greve, T; Callesen, H. 1998. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol. Reprod. Dev. 51:53-58.

Xu, K.P., H.C. Greve, y P. Hyttel. 1987. Co-culture of granulose cells with or without estrogens .J. Reprod. Fertil. 81: 501-504.

Vajta, G.; Rindom, N.; Peura, T; Holm, P; Greve, T; Callensen, H. 1999. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. Theriogenology 52:939-948.

Vera Muñoz, O. 2001. Técnicas de laboratorio para la evaluación del semental bovino. Seminario Internacional sobre biotecnología y patología reproductiva del bovino (1, 2001, Maracay, VE). Maracay, VE. IRAIA, FCV, UCV. p. 504-508

Vera, O; Bastidas, P. 1999. Análisis cromosómico y seminal de sementales Brahman de la Estación Experimental La Cumaca. Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. (4, 1999, Maracaibo,VE). Maracaibo, VE. p. 505-509

Wowk, B.; Leitl, E.; Rasch, C. M; Mesbah-Karimi, N.; Harris, S.; Fahy, G. M. 2000. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. Cryobiology 40:228-236

Yanagimachi, R. 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. En fertilization and embryonic development *in vitro*. Plenum Press, New York, NY, pp. 81-182.

Yang BK, Yang X, Foote RH. 1993. Effect of growth factors on development of IVM/IVF bovine embryos. *Theriogenology* 39:343.