

INFORME PASANTÍA NACIONAL CGR BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA S.A.S

CARLOS EDUARDO REYES ALVARADO

UNIVERSIDAD PEDAGOGICA Y TECNOLOGICA DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TUNJA

2017

INFORME PASANTÍA NACIONAL CGR BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA S.A.S

CARLOS EDUARDO REYES ALVARADO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Médico
Veterinario y Zootecnista

Director

Andrés Marcelo Sanabria Villate

Médico Veterinario Zootecnista

UNIVERSIDAD PEDAGOGICA Y TECNOLOGICA DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TUNJA

2017

NOTA DE ACEPTACIÓN

Según el (las) acta(s) de sustentación No 000539 fue aprobado y calificado este trabajo de grado como satisfactorio por el Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia.

CARLOS EDUARDO RODRÍGUEZ MOLANO

ANGELA MIREYA RODRIGUEZ SALGADO

CARLOS EDUARDO VILLAMIL VELA
Asesor Académico FACIAT

Jurado Calificador

Jurado Calificador

Director del Trabajo

Autor

Tunja, 16 días del mes de marzo de 2017

CONTENIDO

	PÁG.
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ASPECTOS GENERALES DE LA ENTIDAD	9
2.1 CENTRO DE PASANTÍA	9
2.2 UBICACIÓN	9
2.3 MISIÓN	11
2.4 VISIÓN	11
2.5 ORGANIGRAMA	11
2.6 INFRAESTRUCTURA FÍSICA	12
2.7 EQUIPOS E INSUMOS	12
3. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS ...	14
3.1 MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN DURANTE ETAPA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO REPRODUCTIVO BOVINO EN LA PARTE DE MACHO .	16
3.1.1 COLECCIÓN DE SEMEN POR MEDIO DE ELECTROEYACULACIÓN.....	17
3.1.1.1 Equipo	17
3.1.1.2 Sujeción	18
3.1.1.3 Técnica de estimulación	19
3.1.2 COLECCIÓN DE SEMEN CON VAGINA ARTIFICIAL	21
3.2 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL	22
3.2.1 DENSIDAD Y VOLÚMEN SEMINAL	23
3.2.2 MOTILIDAD ESPERMÁTICA	24
3.2.2.1 Examen de motilidad masal	26
3.2.2.2 Motilidad individual	26
3.2.3 MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA	26
3.3 CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN BOVINO	27
3.3.1 CÁLCULOS PARA DETERMINAR LAS CANTIDADES DE DILUYENTE A ADICIONAR	28
3.3.2 EMPACADO Y MARCACIÓN DE PAJILLAS	29
3.3.3 CONGELACIÓN DE PAJILLAS	30
4. ETAPA MEJORAMIENTO GENÉTICO REPRODUCTIVO BOVINO EN LA PARTE DE HEMBRA.....	32
4.1 SELECCIÓN DE DONANTES	33
4.2 SUPEROVULACIÓN	33
4.2.1 FACTORES FARMACOLÓGICOS DE LA SUPEROVULACIÓN	34
4.3 PROTOCOLO USADO EN VACAS DONADORAS	37
4.4 SELECCIÓN DE RECEPTORAS	38
4.5 PROTOCOLO DE RECEPTORAS	40
4.6 RECOLECCIÓN DE EMBRIONES	41
4.6.1 PROCEDIMIENTOS Y CONSIDERACIONES PREVIOS A LA TÉCNICA.....	41

4.6.2 SUJECIÓN	41
4.6.3 DESINFECCIÓN DE INSTRUMENTOS Y LIMPIEZA DE DONANTE	42
4.6.4 PROCEDIMIENTO	42
4.7 OBTENCIÓN Y BÚSQUEDA DE EMBRIONES	44
4.8 EVALUACIÓN Y CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA	46
4.9 EVALUACIÓN	50
4.10 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	51
4.11 TRANSFERENCIA NO QUIRÚRGICA	51
4.12 CONSERVACIÓN DE EMBRIONES	52
4.13 CONGELACIÓN A -196°C	52
5. CONCLUSIONES	55
6. RECOMENDACIONES	56
7. BIBLIOGRAFÍA	57

LISTA DE TABLAS

		PÁG.
TABLA N°1	MAQUINARIA, EQUIPOS E INSUMOS	12
TABLA N°2	DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	14
TABLA N°3	RAZAS DE TOROS COLECTADOS	16
TABLA N°4	RAZAS BOS TAURUS	36
TABLA N°5	RAZAS BOS INDICUS	36
TABLA N°6	PROTOCOLO USADO EN VACAS DONADORAS	37
TABLA N°7	PROTOCOLO RECEPTORAS	40

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
FIGURA N°1	11
FIGURA N°2	17
FIGURA N°3	32
FIGURA N°4	34
FIGURA N°5	35
FIGURA N°6	39
FIGURA N°7	40
FIGURA N°8	45
FIGURA N°9	47
FIGURA N°10	47
FIGURA N°11	48
FIGURA N°12	48
FIGURA N°13	49
FIGURA N°14	49
FIGURA N°15	49
FIGURA N°16	50
FIGURA N°17	54

LISTA DE FOTOS

	PÁG.
FOTO N°1 CENTRO DE PASANTÍA	9
FOTO N°2 ELECTROEYACULADOR	18
FOTO N°3 BRETE O MANGA DE SUJECIÓN	19
FOTO N°4 MANIPULACIÓN CONO DE COLECTA	20
FOTO N°5 ESTIMULACIÓN COLECTA	21
FOTO N°6 COLECTA POR VAGINA ARTIFICIAL	22
FOTO N°7 BAÑO DE MARÍA.....	23
FOTO N°8 MICROSCOPIO Y CÁMARA DE NEUBAUER	24
FOTO N°9 EQUIPOS E INSTRUMENTOS DE EVALUACIÓN SEMINAL	25
FOTO N°10 EVALUACIÓN MOTILIDAD MASAL E INDIVIDUAL	25
FOTO N°11 REGISTRO PARA CONGELACIÓN DE SEMEN ...	27
FOTO N°12 MÁQUINA EMPACADORA DE PAJILLAS	29
FOTO N°13 MÁQUINA MARCADORA DE PAJILLAS	30
FOTO N°14 CAVA DE ICOPOR	31
FOTO N°15 SOPORTE DE METAL	31
FOTO N°16 SUJECIÓN EN BRETE	42
FOTO N°17 SONDA FOLEY	43
FOTO N°18 LABORATORIO MÓVIL	44
FOTO N°19 FILTRO MINITUBE – MINIFLUSH	45
FOTO N°20 ESTEREOMICROSCOPIO Y MESA DE APOYO ...	46
FOTO N°21 PISTOLA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	51
FOTO N°22 MATERIALES PARA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	52
FOTO N°23 CONGELADORA DE EMBRIONES	53

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología bovina moderna surge en la década de los 80, utiliza técnicas denominadas en conjunto “ingeniería genética” para modificar y transferir genes de un organismo a otro. Se trata de técnicas aplicadas a la reproducción que buscan acelerar de forma importante el posible progreso genético resultante de mezclar diferentes genotipos dentro de una misma o distintas especies. El uso de biotecnologías en la reproducción permite, mediante manipulación genética, obtener nuevos y mejores individuos en un menor tiempo respecto a la mejora que se podría lograr con el uso de las técnicas tradicionales y desactualizadas (1).

El mejoramiento en la calidad de un producto (carne, leche) mediante la genética puede hacerse mediante la selección interna de una raza escogiendo los individuos superiores (largo plazo) o bien por la incorporación de genes nuevos y cruzamientos con otras razas (mediano y corto plazo). Así, la incorporación de nuevas tecnologías y biotipos bovinos, ha demandado la aplicación de técnicas como por ejemplo la transferencia de embriones importados, la inseminación artificial, técnicas de fertilización in vitro, sexado de semen y manipulaciones genéticas (1).

Hoy en día en Colombia, a pesar de la llegada de la mayoría de estos procesos, sucede que incluso una de las primeras biotecnologías reproductivas desarrolladas como lo es la inseminación artificial bovina, no alcanza un buen nivel de cobertura a la población de hembras bovinas y lo mismo ocurre con la obtención de terneros por medio de transferencia de embriones. Es por esto que en la actualidad se requieren de profesionales interesados y capacitados no solo en la práctica de estos procesos sino también la investigación de nuevas biotecnologías.

CGR BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA S.A.S al implementar biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF), colecta, evaluación y congelación de semen bovinos entre otros, y al entregar cursos de aprendizaje de los mismos, permite que las biotecnologías reproductivas crezcan e impulsen el crecimiento del sector agropecuario de nuestro país.

Las experiencias y conocimientos adquiridos durante la pasantía en CGR BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA S.A.S permiten que el proceso de formación del estudiante como futuro profesional, se lleve a cabo de manera íntegra, responsable y competente. Esto para que adquiera las capacidades suficientes de llevar si así lo desea, a difundir de manera correcta y consecuente las biotecnologías reproductivas aplicadas en los bovinos.

1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENTIDAD

2.1 CENTRO DE PASANTÍA

Foto N°1 CENTRO DE PASANTÍA



Fuente: Reyes, 2016

1.2 UBICACIÓN

Dirección: km 2 vía Tibitoc, Hacienda la primorosa.

Ubicación: Sector paso ancho, Zipaquirá – Cundinamarca.

Extensión: 8 Fanegadas

Teléfonos: 852 2628 / 852 2522 / 3112599024

Horario de atención: lunes a viernes 7:00 am a 12:00 pm y 2:00 pm a 5:00 pm, sábados 8 am a 12 pm

Altura: 2.650 msnm

Servicios:

División Bovina:

- Selección donante / receptora
- Transferencia de Embriones (T.E)
- Colecta de embriones
- Congelación de embriones
- Inseminación de Artificial a Tiempo Fijo (I.A.T.F.)
- Pruebas sanitarias donantes / receptora

División andrología:

- Evaluación andrológica
- Criopreservación se semen
- Evaluación de semen congelado (pajilla)
- Procesamiento semen externo (pajilla procesada)
- Marcación e identificación de pajilla
- Empaque y sellado de pajilla

División comercial

- Línea hormonal I.A.T.F y T.E para donantes y receptoras.
- Equipos e implementos para inseminación artificial y programas de I.A.T.F.
- Equipos e implementos para transferencia de embriones.
- Equipos e implementos para congelación de semen bovino.
- Venta de animales puros.
- Venta de pajillas de toros nacionales e importados de las principales razas.
- Venta de preñeces garantizadas.

División capacitación

- Untrasonografía bovina.
- Evaluación andrológica, colecta, procesamiento y congelación de semen.
- Especialización en reproducción bovina.
- Inseminación artificial e I.A.T.F.
- Colecta, clasificación, congelación y transferencia de embriones.

1.3 MISIÓN

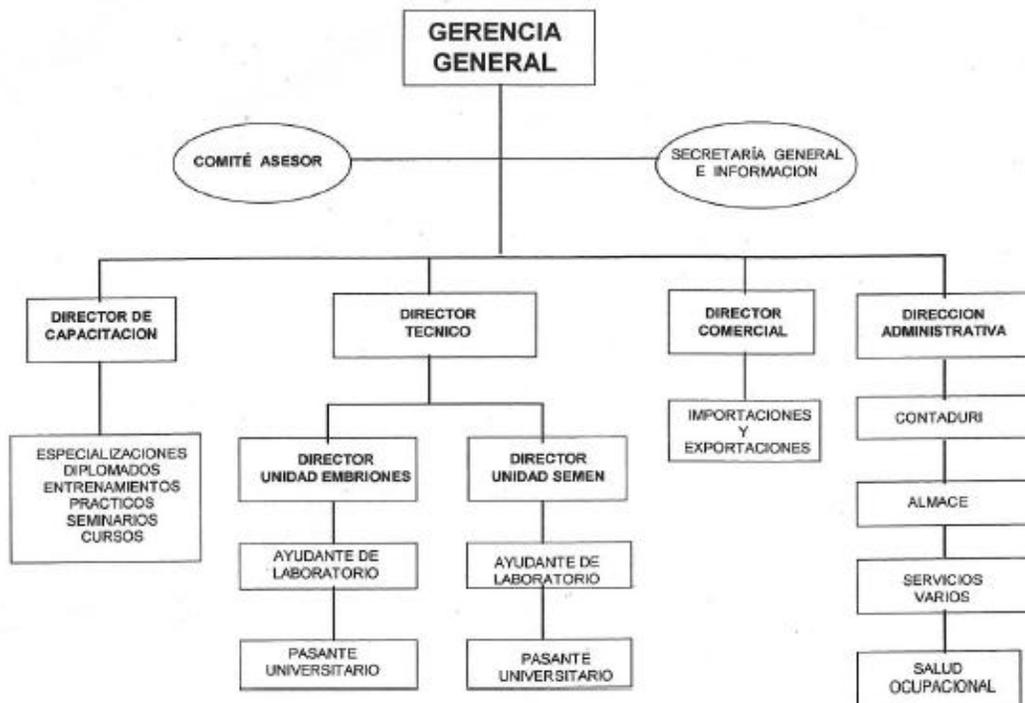
La organización corporativa de nuestra compañía se ha diseñado para ofrecer un completo soporte tecnológico en el área de reproducción aplicada al mejoramiento genético, a través de un amplio portafolio de productos y servicios, con un equipo de trabajo altamente clasificado.

2.4 VISIÓN

Posicionarnos como líderes en la aplicación de la biotecnología en reproducción de grandes animales en Colombia con proyección internacional. La estructura de CGR Biotecnología reproductiva está diseñada para prestar un servicio oportuno de calidad en cada una de las áreas de la reproducción. De esta manera contamos con seis (6) divisiones de servicio en la compañía, en las cuales se cuentan la división bovinos, división equinos, división capacitación, división comercial, división de proyectos y comercio internacional al igual que la división de andrología.

2.5 ORGANIGRAMA

Figura N° 1



Fuente: CGR biotecnología reproductiva

Gerente – Carlos Alberto Gutiérrez Robayo

Secretaría general – Juan Carlos Guzmán

Director de capacitación y Director embriones – Dr. Mauricio González Fajardo

Director semen – José Luis Carranza

Director comercial – Juan Miguel Atuesta

Director administrativo – Claudia Zoraida Zambrano

Contador – William Castañeda Almacén –

Servicios generales – Nelly candil

Salud ocupacional – Amanda Siso

Mensajero – Alberto Romero

2.6 INFRAESTRUCTURA FÍSICA

La empresa CGR biotecnología reproductiva cuenta con una sede central en el municipio de Zipaquirá, en la hacienda la primorosa, allí posee las instalaciones corporativas como también la planta física que se requiere para las diferentes prácticas y procesos con los animales tanto de la empresa como de los clientes, dentro de las instalaciones corporativas tenemos las siguientes oficinas: almacén, administración, área bovinos, gerencia, servicios generales, auditorio, cafetería. En la planta física dispuesta para los animales encontramos: laboratorio de andrología, banco de semen y embriones laboratorio auxiliar, botiquín, brete, toriles, potreros de pastoreo, potrero de cuarentena, bodega.

2.7 EQUIPOS E INSUMOS

Los principales equipos e insumos que posee la empresa son:

Tabla 1. MAQUINARIA, EQUIPOS E INSUMOS

Laboratorio de andrología	<ul style="list-style-type: none">• Maquina empacadora de pajillas• Maquina marcadora de pajillas
---------------------------	--

	<ul style="list-style-type: none"> • Electroeyaculador • Microscopio • Baño de maría • Destiladora de agua • Nevera • Cetrifugadora • Cavas de icopor • Vaginas artificiales • Instrumentos de laboratorio • Cámara de neubauer
Laboratorio auxiliar	<ul style="list-style-type: none"> • Estereomicroscopio • Calentador de agua • Autoclave • Estilete para colecta de embriones
Bovinos	<ul style="list-style-type: none"> • Ecógrafo • Estereomicroscopio
Almacén	<ul style="list-style-type: none"> • Jeringas • Guantes • Productos hormonales • Fundas de inseminación • Camisas sanitarias • Pistolas de inseminación • Escalerillas • Medios de mantenimiento para embriones • Filtros minutube
Botiquín	<ul style="list-style-type: none"> • Medicamentos • Narigueras • Cabezales
Banco de semen y embriones	<ul style="list-style-type: none"> • Termos de criopreservación

Fuente: Reyes, 2016

3 DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

Tabla N° 2

TIEMPO		1° MES				2° MES				3° MES				4° MES				5° MES				6° MES			
		SEMANA				SEMANA				SEMANA				SEMANA				SEMANA				SEMANA			
ACTIVIDAD		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Etapa mejoramiento genético reproductivo bovino en la parte de macho	<ul style="list-style-type: none"> - Alistamiento de materiales para colecta y congelación de semen. - Apoyo logístico en la selección de toros y colecta de semen. - Apoyo en alimentación y mantenimiento de los animales y área de los mismos. - Chequeos o diagnósticos de toros. - Elaboración de informes estadísticos respecto a congelación de semen. - Seguimientos sanitarios a las diferentes fincas propiedades de la central. - Seguimiento nutricional de bovinos según procedimiento interno 																								
Etapa mejoramiento genético reproductivo bovino en la parte de hembra	<ul style="list-style-type: none"> - Alistamiento de materiales para sincronización, colecta y congelación de embriones. - Aplicación de líneas hormonales según protocolo dado por el técnico. - Apoyo logístico de selección de receptoras y donantes. - Chequeos o diagnósticos de receptoras preñadas y vacías. 																								

3.1 MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN DURANTE ETAPA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO REPRODUCTIVO BOVINO EN LA PARTE DE MACHO

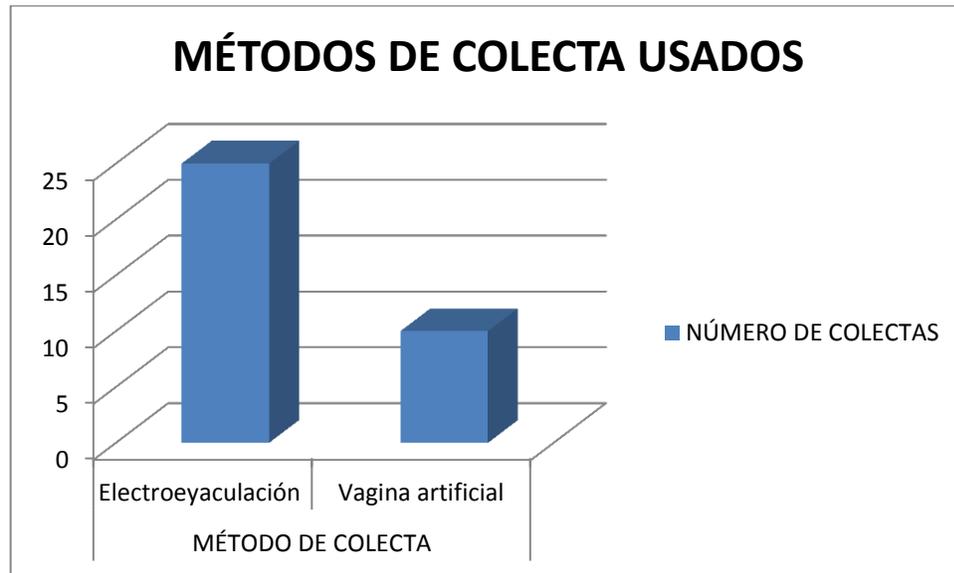
Existen hoy en día tres métodos para la colecta de semen bovino; colecta de semen con electroeyaculador, colecta de semen con vagina artificial y colecta de semen por medio de masaje. En la actualidad este último se ha dejado de usar ya que es poco práctico y posee varias desventajas en relación a los otros dos. Algunas de las desventajas incluyen irritación de la mucosa rectal por la excesiva frotación manual, la falta de protrusión del pene que resulta colecciones de muestras contaminadas desde el prepucio. La necesidad de una segunda persona para la colección de la muestra y la dificultad de estimular toros excitados o de mal carácter, así como el número limitado de toros que se pueden hacer en un tiempo determinado, dado que el procedimiento es agotador para la persona que realiza el masaje. (2).

Tabla N° 3

RAZAS DE TOROS COLECTADOS		
RAZA	NÚMERO DE COLECTAS	MÉTODO DE COLECTA
Gyr (HB Garbancho)	10	Electroeyaculación
Simmental (Ruakana)	7	Electroeyaculación
Hostein Rojo (Debona delirio)	4	Vagina artificial
Blonde d'aquitaine (Lionel 09 TE)	4	Vagina artificial
Holstein (Merlin)	3	Electroeyaculación
Beefmaster (Pelé)	2	Electroeyaculación
Gyrolando (173-20)	2	Electroeyaculación
Holstein (Duende)	2	Vagina artificial
Angus rojo (HSF Andaluz)	1	Electroeyaculación
TOTAL	35	

Fuente: Reyes, 2016

Figura N° 2



Fuente: Reyes, 2016

Como se observa en la Figura N°2 el método de colecta que más se usó en el periodo de apoyo en andrología bovina en CGR biotecnología reproductiva, fue el método de electroeyaculación, ya que los animales presentes en las instalaciones o bien no han sido acostumbrados previamente a la colección por medio de vagina artificial o su temperamento no lo permite.

3.1.1 Colección de semen por medio de electroeyaculación

La colección de semen con electroeyaculador permite extraer semen a toros sin previo acostumbramiento. Esto es de suma importancia para la evaluación de los toros a campo, donde la colección de semen se puede realizar en la manga al mismo tiempo del examen clínico.

3.1.1.1 Equipo

En el centro de colección de semen de la empresa CGR se usa una terminal con tres electrodos distribuidos con una separación de 1 cm y posee una extensión en forma de U que se ubica alrededor de la cola para asegurar una apropiada orientación de los electrodos durante la electroeyaculación, esta terminal produce una apropiada protrusión del pene y electroeyaculación con una mínima estimulación de toros musculosos. (2)

Foto N° 2 ELECTROEYACULADOR



De arriba hacia abajo tenemos: terminal de 3 electrodos, mango para manipular el cono de colecta, batería portátil. Fuente: Reyes, 2016

3.1.1.2 Sujeción

Para la extracción de semen por electroejaculador se recomienda tener una manga de 76 cm de ancho que puede albergar a la mayoría de los toros. Debe colocarse detrás del toro un poste fuerte a una altura ideal de 71 – 76 cm y otro poste a una altura de 30 cm del suelo como corrector durante la electroejaculación dado que es común que los toros pierdan el equilibrio. Si es posible los toros deben estar parados literalmente y la manga debe tener un buen piso. Los toros que son inmovilizados de la cabeza con el cuerpo comúnmente se arrodillan y luego durante la electroejaculación se echan y en estos casos un cinturón por debajo del tórax puede ser de utilidad. (3)

Foto N° 3 BRETE O MANGA DE SUJECIÓN



Toro raza Gyrolando con cinturón de soporte por debajo del pecho y de la ingle para evitar la pérdida de equilibrio y posterior postración del animal durante el procedimiento. Fuente: Reyes, 2016

3.1.1.3 Técnica de estimulación

La cantidad de estimulación debe ser estimada a través de la respuesta del toro y no prestando atención al voltaje del aparato. La primera estimulación debe ser pequeña hasta que el toro demuestre una respuesta mínima, las estimulaciones sucesivas deben ser incrementadas de a poco, deben durar uno o dos segundos y después deben discontinuarse por medio segundo antes de comenzar con la siguiente estimulación (2). El líquido preseminal no debe ser colectado porque diluye el eyaculado y puede llevar a falsos resultados. Cuando el fluido comienza a ponerse más espeso y opaco comienza la colección en el cono o en el tubo de examinación colocado directamente en el pene (3).

Foto N°4 MANIPULACIÓN CONO DE COLECTA



Debemos manipular el instrumento que sostiene el cono de colecta de tal manera que la parte que va directamente sobre el pene del toro, esté en dirección del piso evitando así que se contamine la muestra seminal. Fuente: Reyes, 2016

El Dr. José Luis Carranza director del área de andrología de CGR y quien nos supervisó durante las prácticas de colecta, evaluación y congelación de semen. Instauro los siguientes pasos para la colecta por medio de electroeyaculación

- Sujeción de toro con las correctas instalaciones para evitar cualquier daño físico tanto del animal como de los operarios.
- Examen clínico completo donde se incluye la palpación rectal y de los órganos reproductivos accesorios del toro.
- Estimulación previa vía rectal, donde se hace un masaje longitudinal de atrás hacia adelante sobre las ámpulas, la próstata y la uretra.
- Inserción de la bala del electroeyaculador por el recto con su la previa lubricación.
- Este electroeyaculador posee la opción de realizar la descarga de los pulsos eléctricos de manera automática, así que después de conectar la batería portátil a la terminal y prender el aparato, nos queda observar la consistencia y color del semen para ser colectado.
- Una vez el toro eyacule semen como tal, se deberá mantener el botón ubicado en el control del electroeyaculador sostenido. Este nos permitirá asegurar que el toro reciba el umbral eléctrico necesario para la eyaculación de la muestra seminal.
- Una vez el toro termina su eyaculado se debe cubrir la muestra de los rayos solares y del medio ambiente y ser llevado al laboratorio lo antes posible.

Foto N° 5 ESTIMULACIÓN COLECTA



Vía rectal se hace masaje sobre las glándulas accesorias del toro. Fuente: Reyes, 2016

3.1.2 COLECCIÓN DE SEMEN CON VAGINA ARTIFICIAL

Los toros seleccionados para la colección se semen con vagina artificial deben ser mansos, de bozal y entrenados con nariguera. El animal de monta debe estar sujeto a un brete angosto de lados. Los toros que no están acostumbrados a servir en vagina artificial pueden necesitar una vaca en estro para que el procedimiento sea exitoso. Como alternativa, una hembra sedada (xilacina, 0.03 mg/Kg) (14) sujeta en el brete de monta puede facilitar la colección. La vagina artificial es preparada llenado la camisa interna con agua lo suficientemente caliente para resultar en una presión de la vagina artificial. Finalmente, ésta es lubricada con gel estéril no espermicida. (4)

Foto N° 6 COLECTA POR VAGINA ARTIFICIAL



Toro Blonde d'aquitaine y como animal señuelo vaca Simmental. Fuente: Reyes, 2016

Cuando el toro realiza la monta, quien colecte debe estar atento a avanzar inmediatamente y dirigir el pene a la apertura de la vagina artificial. El pene nunca debe ser manejado directamente, sino desde el prepucio. La vagina artificial no debe ser empujada sobre el pene; el toro hará movimientos de búsqueda que deben permitirse para que empuje dentro de la vagina. El empuje es extremadamente vigoroso y un colector desprevenido puede perder el equilibrio o la vagina artificial se le puede escapar de las manos (2).

Algo que vale la pena mencionar y que se pudo comprobar en las diferentes colectas, fue el tema de la temperatura de la vagina artificial, esta puede variar en varios grados de un animal a otro, y es necesario hallar a que temperatura eyacula cada toro. En el caso de un toro Holstein negro donde al cual se le prestó el servicio de colecta por vagina artificial por parte de la empresa CGR, el cual fue necesario llevar la temperatura del agua hasta los 60 °C, de lo contrario, este toro no eyaculo en varios intentos de colecta con vagina artificial.

3.2 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL

Una de las principales tareas como pasantes durante el tiempo que estuvimos apoyando el área de andrología, fue el de realizar la evaluación en el laboratorio de cada una de las muestras seminales tomadas. Allí fuimos capacitados y evaluados en el análisis de las características macroscópicas y microscópicas de

cada muestra toma. Las características macroscópicas comprenden: su olor, el volumen eyaculado, su aspecto y su color. Y dentro de la evaluación microscópica tenemos motilidad masal, motilidad individual, morfología y concentración.

Una vez es colectada la muestra en el brete, se debe llevar la muestra lo más pronto posible al laboratorio, allí se pondrá a baño de maría entre los 33 °C y 34 °C

Foto N° 7 BAÑO DE MARÍA



Introducción de las muestras de semen frescas. Fuente: Reyes, 2016

3.2.1 DENSIDAD Y VOLUMEN SEMINAL

En el laboratorio de andrología de la empresa CGR Biotecnología reproductiva, las características como densidad y motilidad seminal se describen como Muy Buena (MB), Buena (B), Regular (R) y Mala (M). Esta descripción ha sido usada en los últimos 30 años en la gran mayoría de los centros de reproducción y andrología bovina y tiene un significado específico que deber ser aplicado uniformemente por todos aquellos que evalúen semen. La descripción de densidad espermática es (5):

- **Muy buena (MB)** = apariencia granulosa con 750 millones a 1000 millones o más de espermatozoides por ml.
- **Buena (B)** = semen opaco, lechoso con 400 millones a 750 millones de espermatozoides por ml.
- **Regular (R)** = semen como leche aguda con 250 a 400 millones de espermatozoides por ml.
- **Malo (M)** = semen translucido u acuoso con menos de 250 millones de espermatozoides por ml (5).

La estimación de la concentración en el laboratorio de andrología se realiza por medio de la cámara de Neubauer y en un microscopio de gran capacidad.

Foto N° 8 MICROSCOPIO Y CÁMARA DE NEUBAUER



En la parte inferior izquierda aparato que nos ayudará en el conteo de los espermatozoides. Fuente: CGR Biotecnología Reproductiva. Fuente: Reyes, 2016

3.2.2 MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Los espermatozoides están en un estado latente dentro de la cola del epidídimo. Para ser móviles, los espermatozoides necesitan de un pH normal. Temperatura templada, un medio con osmolaridad balanceada, y de adecuada concentración de iones y nutrientes en el fluido seminal (2).

Dentro de la evaluación de la motilidad espermática tenemos que evaluar tanto la motilidad masal como la individual, estos dos procedimientos los podemos realizar en campo, con los diferentes equipos e instrumentos que transporta el equipo de andrología en cada servicio de colecta por fuera de las instalaciones de la empresa CGR biotecnología.

Foto N° 9 EQUIPOS E INSTRUMENTOS DE EVALUACIÓN SEMINAL



Microcopio, plátina termostática, cava de icopor para transporte de muestras seminales, caja plástica con utensilios de laboratorio. Fuente: Reyes, 2016

Foto N° 10 EVALUACIÓN MOTILIDAD MASAL E INDIVIDUAL



Fuente: Reyes, 2016

3.2.2.1 Examen de motilidad masal

La determinación de la motilidad masal se hace utilizando una gota de semen colocada sobre un porta objeto tibio y sin cubreobjeto. La observación se realiza bajo un campo luminoso con una aumento de 40 - 125x. la siguiente descripción se utiliza para evaluar la motilidad masal.

- Muy buena (MB) = movimientos en ondas vigoroso y en remolinos.
- Buena (B) = remolinos y ondas más lentas.
- Regular (R) = sin remolinos, pero con oscilaciones generalizadas.
- Malo (M) = escasa o ninguna motilidad individual.

Es importante aclarar que la motilidad masal va a depender de tres factores: coconcentración, porcentaje de células con movimiento progresivo y velocidad de movimiento de los espermatozoides. Cuando uno de estos factores se encuentra deprimido las ondas rápidas en remolinos esperadas son severamente deprimidas o eliminadas. (5).

3.2.2.2 Motilidad Individual

La observación de la motilidad individual y la estimación del porcentaje de células con movimiento progresivo nos dan la información de la integridad de la membrana de los espermatozoides, así como también de la integridad morfológica de los espermatozoides (5).

Para la observación de la motilidad individual son necesarios porta y cubre objetos nuevos, perfectamente limpios y tibios, para la preparación de las muestras. Se debe preparar la primera muestra con semen sin diluir, incluso cuando la cantidad de espermatozoides haga difícil determinar la cantidad de células con movimiento progresivo. Una gota de semen de 3-4 mm es suficiente grande para que el fluido se extienda apenas hasta el borde del cubre objetos formando una fina capa donde todos los espermatozoides se encuentran en un mismo plano focal. La motilidad. (4).

3.2.3 MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA

El estudio de la morfología espermática es muy importantes a los fines de establecer porcentajes de espermatozoides normales y poder clasificar las anomalías. Existe una correlación entre defectos espermáticos e infertilidad y se considera tolerable hasta un 30 % de anomalías.

En el laboratorio de andrología de CGR, se realiza un frotis del semen el cual es coloreado con la tinción eosina – nigrosina, y se observa al microscopio en el mayor aumento 100x con la aplicación de aceite de inmersión. La tinción de eosina – nigrosina es una de las más usadas comunmente en la examinación morfológica del esperma, ya que esta ademas de permitir la evaluación morfológica de los espermatozoides, nos permite correlacionar el porcentaje de vivos que se ha estimado anteriormente, con la motilidad progresiva, ya que si esta tinción se lleva a cabo correctamente permite distinguir entre espermatozoides vivos y muertos.

3.3 CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN BOVINO

Una vez se termina la evaluación de las muestras seminales tomadas, el siguiente paso es el procesamiento de la muestras para su posterior empaqueo y congelación. Los datos necesarios para el inicio del procesamiento del semen son el volumen total eyaculado y su concentración en millones de espermatozoides por ml, de allí parten los cálculos para determinar la cantidad de diluyente que este necesita para poder ser congelado. Como lo observamos a continuación:

Foto N° 11 REGISTRO PARA CONGELACIÓN DE SEMEN

CGR - BIOTECNOLOGIA REPRODUCTIVA										
UNIDAD DE PROCESAMIENTO DE SEMEN BOVINO										
ZIPAGUIRA - COLOMBIA										
REGISTRO PARA CONGELACION DE SEMEN										
RAZA	NOMBRE Y/O NUMERO DEL TORO			FECHA DE NACIMIENTO		REGISTRO ASOCIACION - No.				
CGR	H13 PAlcones Carbon									
FECHA DE CONGELACION	MUNICIPIO	NOMBRE DEL C.T.A. o FINCA			NOMBRE DEL PROPIETARIO Y TELEFONO					
12/07/16	Zipaguira	Los Primrosos			CGR Biotecnología					
PROCESAMIENTO DEL SEMEN										
METODO UTILIZADO: Electroeyaculador () Vagina artificial (X) Protusión (Si) (No)										
ANALISIS DEL SEMEN										
No.	Volumen (ml)	Concentración (10 ⁶ /ml)	Total eyaculado	Morfología (%)		Congelado		PASOS PARA ADICIONAR PARTE B a 5°C (Cálculos)		
				Masa +1 a -5 (10 X)	Progresiva rápida (20 X-40 X)	SI	NO	No. Orden	Hora	Cantidad a adicionar
1	10	2930	29300					1		36
2	12	1780	21360					2		36
3								3		36
4								4		36
5								5		36
TOTAL	23	1855	42665							36
CALCULOS PARA DETERMINAR LAS CANTIDADES DE DILUYENTE A ADICIONAR										
23 x 1855 = 42665 90 = 474										
Vol. Semen x 10 ⁶ Spz/ml = Total Spz / 30 = 100 Spz/µl = TOTAL PAJILLAS										
474 x 0.26 = 260 / 2 =										
TOTAL PAJILLAS x Vol. Paj. ml = Vol. FINAL, ml, dividido en 2 = Vol. PARTE A, ml. = Vol. PARTE B, ml										
260 x 46 = 214										
Vol. Parte A ml. = Vol. semen = Vol. NETO PARTE A, ml. Vol. PARTE B, ml. Dividido en No. pasos = VOL. POR PASO PARTE B										

Acá encontramos los datos generales de la colecta como raza y nombre del toro, registro asociación, fecha de colecta, municipio y propietario. También observamos los cálculos que se deben realizar para el procesamiento del semen.

Fuente: Reyes, 2016

Una de las tareas en el área de andrología, fue la de diligenciar estos formatos con base en los datos obtenidos en la colecta y posterior evaluación seminal,

además de realizar los cálculos necesarios para hallar las cantidades de diluyente a adicionar, datos necesarios para el procesamiento y posterior criopreservación.

3.3.1 CÁLCULOS PARA DETERMINAR LAS CANTIDADES DE DILUYENTE A ADICIONAR

Ejemplo 1:

- Total, volumen eyaculado: 23 ml
- Concentración: 1855 (10^6 /ml)

$23 \times 1855 \times 0.8 = 42665$ (total espermatozoides)

$$42665 \quad - \quad \mathbf{90 \quad (10^6/ml)} \quad = \quad 474 \quad \text{Total pajillas}$$

(concentración por pajilla)

$$474 \times \mathbf{0,55} \quad = \quad 260 \quad (\text{ml}) \quad \text{Volumen final de diluyente}$$

(volumen pajilla ml)

$$260 \quad - \quad \mathbf{46} \quad = \quad 214 \quad (\text{ml}) \quad \text{Volumen neto a adicionar}$$

(volumen de semen y diluyente adicionado anteriormente ml)

Una vez se determine la cantidad de diluyente que se adicionará a la toma de semen, se debe dividir el diluyente en varios pasos para su adición. La cantidad de pasos en que se divide el diluyente depende de la calidad del semen, si es un semen de buena calidad se hará en pocos pasos, de 2 a 4 y si el semen se considera de regular calidad la adición del diluyente se hará en muchos más pasos, de 6 a 8. Esta consideración se basa en el efecto del crioprotector sobre los espermatozoides, ya que el glicerol presente en los aditivos del diluyente se encarga de ingresar a las células espermáticas y durante este proceso algunas de ellas mueren, por esta razón se busca proteger el semen de menor calidad con un número mayor de pasos para adicionar el diluyente disminuyendo la acción nociva del crioprotector. La adición de cada fracción de diluyente tiene un intervalo de 15 m y se hará a una temperatura de 5 °C tanto de la toma de semen como del diluyente.

Independiente de si es una fracción o dos el semen, una vez diluido debe empezar una curva de frío lenta para que éste llegue a 5C en un lapso de 2 horas. Una vez se logran los 5C, si hay que añadir la fracción B, ésta se añade también a 5C (2). Después de diluido completamente el semen viene el siguiente paso que es el periodo de equilibrio que puede durar de 2-24 horas y se realiza a 5C. En este tiempo el crioprotector penetra las membranas del espermatozoide para protegerlo de los daños que se pueden generar durante la criopreservación y la descongelación. (3).

3.3.2 EMPACADO Y MARCACIÓN DE PAJILLAS

El empacado del semen en pajillas de 0.55 ml, en la empresa CGR se realiza con una maquina empacadora IMV, esta empaca 4 pajillas por segundo, después de obtenidas las pajillas se llevaran a la máquina marcadora, ella podra en la pajilla el nombre del toro, su número de registro ante la asociación de la raza, y el nombre del centro de genética donde realizo el proceso.

Foto N°12 MÁQUINA EMPACADORA DE PAJILLAS



IMV. Fuente: Reyes, 2016

Foto N°13 MÁQUINA MARCADORA DE PAJILLAS



MiniTube Fuente: Reyes, 2016

3.3.3 CONGELACIÓN PAJILLAS

Este proceso en el laboratorio de andrología se realiza de la siguiente manera; una vez una vez empacado el semen en las pajillas y alcanzado el equilibrio, se congelan las pajillas en vapores de nitrógeno líquido, (-120 °C) por un lapso de 10 a 15 m luego se sumergen las pajillas en el nitrógeno líquido donde alcanzan una temperatura de -195 °C. este procedimiento se realiza en cava de icopor con nitrógeno líquido y un soporte de metal (6).

Foto N°14 CAVA DE ICOPOR



En esta se realiza la congelación de las pajillas con nitrógeno líquido. Fuente: Reyes, 2016

Foto N° 15 SOPORTE DE METAL



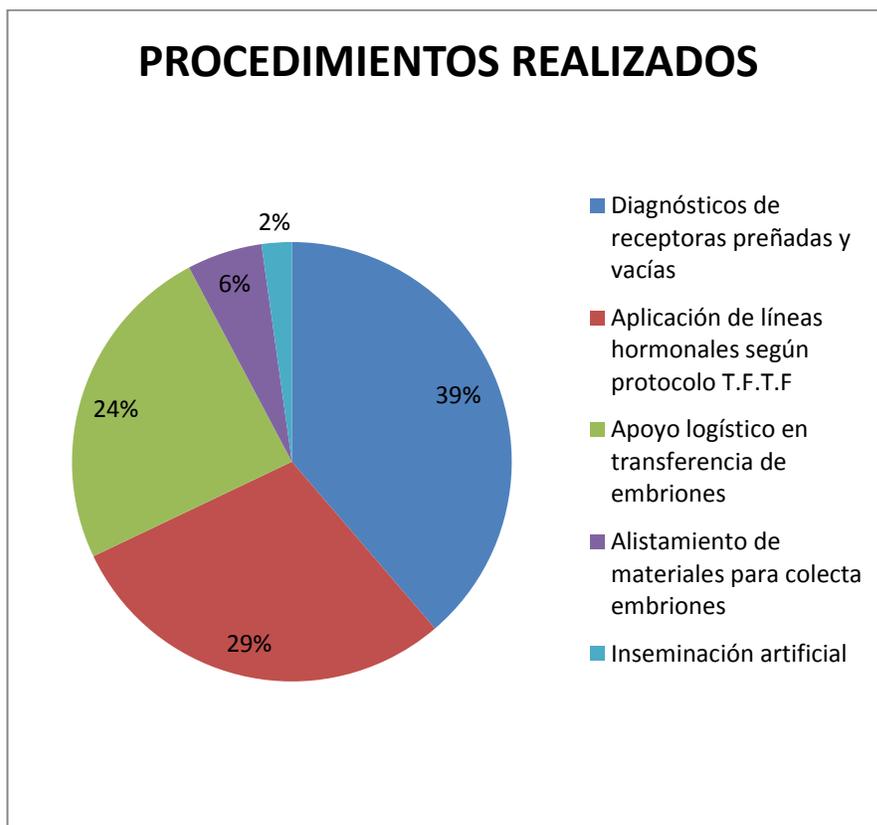
Allí se sitúan las pajillas para su congelación. Fuente: Reyes, 2016

Muy importante el proceso de evaluación del semen postdescongelación. Se considera que el semen apto para usar en inseminación artificial convencional, debe tener al menos 10 millones de espermatozoides viables a la descongelación, y este semen debe tener una motilidad progresiva mínima del 30-35%. También se le debe realizar una prueba de resistencia que consiste en evaluar la motilidad del semen por dos horas. El semen debe tener al menos 5% de motilidad a las dos horas de descongelado. También se debe tomar una pajilla y enviarse para cultivo microbiológico (6).

4. ETAPA MEJORAMIENTO GENÉTICO REPRODUCTIVO BOVINO EN LA PARTE DE HEMBRA

La transferencia de embriones se ha convertido en los últimos 30 años en una de las herramientas de la reproducción más usadas en nuestro país, y CGR Biotecnología Reproductiva es una de las empresas pioneras en la prestación de este servicio a lo largo del territorio colombiano. Durante el periodo en el cual se dio apoyo al área de mejoramiento reproductivo bovino de la hembra se realizaron bastantes procedimientos en relación a la transferencia de embriones donde las principales actividades desarrolladas fueron: alistamiento de materiales para sincronización, colecta y congelación de embriones, aplicación de líneas hormonales según protocolo dado por el técnico o médico veterinario, Chequeos o diagnósticos de receptoras preñadas y vacías, apoyo logístico en con colecta, transferencia de embriones e inseminaciones artificiales en vacas donadoras de embriones.

Figura N°3



Fuente: Reyes, 2016

4.1. SELECCIÓN DE DONANTES

Una de las actividades desarrolladas durante la pasantía fue el apoyo logístico de selección de receptoras y donantes, esta labor es muy importante en un protocolo de transferencia de embriones a tiempo fijo (T.E.T.F), ya que una adecuada selección nos indicará el estado nutricional, sanitario y reproductivo de la vaca, y de estas dependerá el éxito en la producción de embriones por parte de la vaca seleccionada.

A la hora de la selección de las vacas donadoras se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

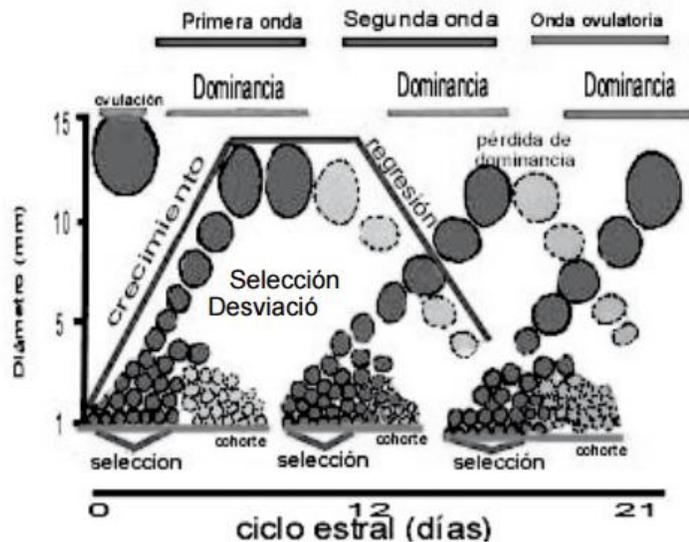
- Edad: vacas de menos de 15 meses no son aptas, así como vacas de edad muy avanzada, cerca de los 15 o más años.
- Estado nutricional: condici^ona corporal de 3 a 4, peso
- Estado reproductivo: vacas que estén ciclando y que no presenten anomalías anatómicas en su aparato reproductor. Para este podemos ayudarnos de un ecógrafo o por medio de palpación.
- Gran valor genético: el propósito de seleccionarla como vaca donadora de embriones, es asegurar que esa vaca tiene características que la hacen superior a otras vacas y que deseamos verlas reflejadas en su progenie.
- Estado sanitario: El profesional experimentado deberá efectuar un amplio examen sanitario y reproductivo del animal, las principales enfermedades de las cuales deben estar libres y se deberán aplicar las vacunas apropiadas antes de la superovulación. Todos los tests sanitarios necesarios para la exportación de embriones deberán realizarse antes de su recuperación. (7).

4.2 SUPEROVULACIÓN

Antes de hablar de los protocolos de superovulación es importante recordar algunos aspectos importantes sobre la fisiología folicular de la vaca y del papel de los medicamentos hormonales sobre ella.

El ciclo estral en el bovino se caracteriza por la presencia de 2-3 ondas foliculares, cada una de las cuales se distingue por una etapa de reclutamiento de 20-30 folículos, crecimiento y selección de un folículo dominante y posterior atresia en caso de no haber luteolisis. Cada onda tiene una duración de alrededor de 8-10 días, la cual depende de la presencia del cuerpo lúteo (8) (figura 5).

Figura N° 4

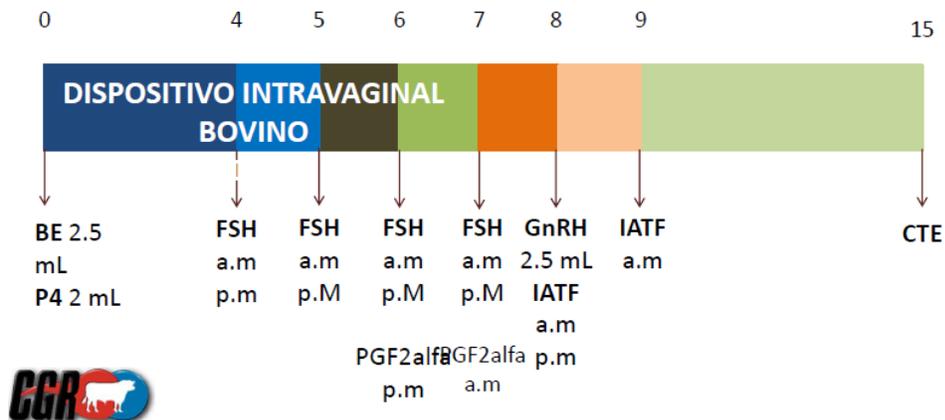


Observamos en la Figura N° 4 “Ondas Foliculares” como sucede la dinámica folicular, desde el reclutamiento de la cohorte de oocitos, pasando por la selección hasta llegar a la dominancia y posterior regresión de los folículos que han sido subordinados. Observamos tres ondas foliculares en la gráfica. Fuente: Jiménez C, Universidad nacional de Colombia, 2009.

4.2.1 FACTORES FARMACOLÓGICOS DE LA SUPEROVULACIÓN

En este punto se debe considerar el tipo de FSH y la presentación comercial. Dentro de los productos varía la potencia, dada en muchos casos por la relación FSH/LH. Los resultados también pueden variar según la dosis total, si se usan dosis decrecientes o constantes, los intervalos y por cuántos días se realiza el tratamiento.

Figura N°5



Contemplamos en este Protocolo de Superovulación, usado en CGR Biotecnología Reproductiva, el intervalo de aplicación de la FSH, el cual se hace transcurridas 12 entre una y otra dosis. La aplicación de la FSH empieza al 4 día de iniciado el protocolo y por un total de 4 días. Fuente: CGR biotecnología veterinaria, división capacitación, Dra. Karen Montoya

Hormona folículo estimulante (FSH) La hormona más utilizada para superovular el bovino es la FSH, la cual puede ser de origen ovino, porcino o bovino. Esta hormona tiene una vida media corta, y por consiguiente requiere de varias aplicaciones (3-4 días) para lograr su efecto. Los productos comerciales que se encuentran disponibles en el mercado son:

- Folltropin® De origen porcino. 20 cc/vial = 400 mg FSH-NIH-P1 (20mg/cc)
- Ovagen® De origen Ovino. 20 cc/vial = 17,6 mg NIADDK oFSH17 (0,88 mg/cc)
- Pluset® 2 viales con 500 UI FSH y 500 UI LH c/u (10 cc/vial) 50 UI FSH y de LH/cc por vial
- Supero-Ov® 75 mg NIH-FSH-P1
- FSH-P® 50 mg Unidades Armour por vial (salió del mercado)

Las dosis de FSH se denominan Dosis Total, la cual va a ser o no dividida en varias aplicaciones. Es importante considerar que la dosis de FSH varía con el tipo de FSH, la especie animal (taurus/indicus) y con la raza (incluso hay variabilidad entre los individuos de una misma raza). Por consiguiente, se deben considerar los reportes y las experiencias previas para determinar cuál es la dosis más adecuada (9):

- Ganado de leche 1 dosis total
- Ganado de carne 50-75% del total
- Novillas 80% de la dosis del animal adulto

Otro estudio realizado por el Dr. Mauricio González director del área de bovinos sobre la dosis de fármacos con FSH que se debe usar en las vacas y novillas de las razas; Jersey, Holstein y Angus por parte de las bos taurus y por el lado de las bos indicus en vacas y novillas de las razas Brahman Gyr y Guzerat. Dando como resultado las siguientes tablas:

Tabla N° 4

RAZAS BOS TAURUS			
TIPO	RAZA	PLUSET (UI)	FOLLTROPIN (%)
Vacas	JERSEY	400 - 500	50
	HOLSTEIN	600	60 – 70
	BRAUNVIEH	500 – 600	60 – 70
	ANGUS	500 – 600	60 – 70
Novillas	JERSEY	300 - 400	33 – 50
	HOLSTEIN	400 – 500	33 – 50
	BRAUNVIEH	400 – 500	33 – 50
	ANGUS	400 - 500	33 – 50

Fuente: Mauricio G Fajardo Esp, 2016.

Tabla N° 5

RAZAS BOS INDICUS			
TIPO	RAZA	PLUSET (UI)	FOLLTROPIN (%)
Vacas	BRAHMAN	300 - 400	50
	GYR	300 - 400	40 – 50
	GUZERAT	300 - 400	40 – 50
Novillas	BRAHMAN	300	33 – 40
	GYR	300	33 – 40
	GUZERAT	300	33 – 40

Fuente: Mauricio G Fajardo Esp, 2016.

Acá es importante resaltar las diferencias en las respuestas superovulatorias de las razas bos Taurus y de las razas bos indicus, por lo general las razas bos indicus son más susceptibles a los fármacos hormonales con FSH y de la misma manera ocurre con la respuesta ovárica de las novillas en comparación con las vacas. Por esta razón es primordial que el profesional conozca la suficiente información sobre la respuesta ovulatoria, para no administrar dosis excesivas que puedan conllevar a problemas reproductivos al final del protocolo de TETF.

4.3 PROTOCOLO USADO EN VACAS DONADORAS

Tabla N°6

Día	Fecha	Hora	Actividad
JUEVES	20 – oct-2016	8:00 a.m.	DIB ® + Gestavec ® : 2ml, im + SINCRODIOL ® 2.5 ml, im
LUNES	24 – oct-2016	6:00 a.m.	FOLLTROPIN V® : 2.0 ml, im
LUNES	24 – oct-2016	6:00 p.m.	FOLLTROPIN V® : 2.0 ml, im
MARTES	25 – oct-2016	6:00 a.m.	FOLLTROPIN V® : 1.5 ml, im
MARTES	25 – oct-2016	6:00 p.m.	FOLLTROPIN V® : 1.5 ml, im
MIÉRCOLES	26 – oct-2016	6:00 a.m.	FOLLTROPIN V® : 1.0 ml, im
MIÉRCOLES	26 – oct-2016	6:00 p.m.	FOLLTROPIN V® : 1.0 ml, im
JUEVES	27 – oct-2016	6:00 a.m.	FOLLTROPIN V® : 0.5 ml, im + SINCROCIO ® 2ml + RETIRO DE DIB
JUEVES	27 – oct-2016	6:00 p.m.	FOLLTROPIN V® : 0.5 ml, im
VIERNES	28 – oct-2016	6:00 a.m.	FERTAGYL® : 2.5 ml, im
VIERNES	28 – oct-2016	6:00 p.m.	IATF x 2
SÁBADO	29 – oct-2016	6:00 a.m.	IATF
VIERNES	04 – nov- 2016	6:00 a.m.	Colecta, transferencia y congelación de embriones
VIERNES	11 – nov-2016	8:00 a.m.	SINCROCIO ® 2ml, im

Fuente: Mauricio G Fajardo Esp, 2016.

El protocolo señalado en la Tabla N° 6 es uno de los protocolos que se usan en la empresa CGR Biotecnología Reproductiva para la superovulación en vacas donantes, en este cabe destacar la importancia de lo explícito de las indicaciones dadas, es muy importante que cada uno de los pasos a realizar por el personal encargado del desarrollo del protocolo, sea de la manera más clara y entendible, de esto dependerá que no se cometan errores que pueden llevar al fracaso de todo el protocolo. Aquí se redacta de la forma más legible el día, fecha y horario en el cual se deben aplicar los fármacos, se deben realizar las inseminaciones artificiales y se hacen los retiros de dispositivos intravaginales con progesterona (10).

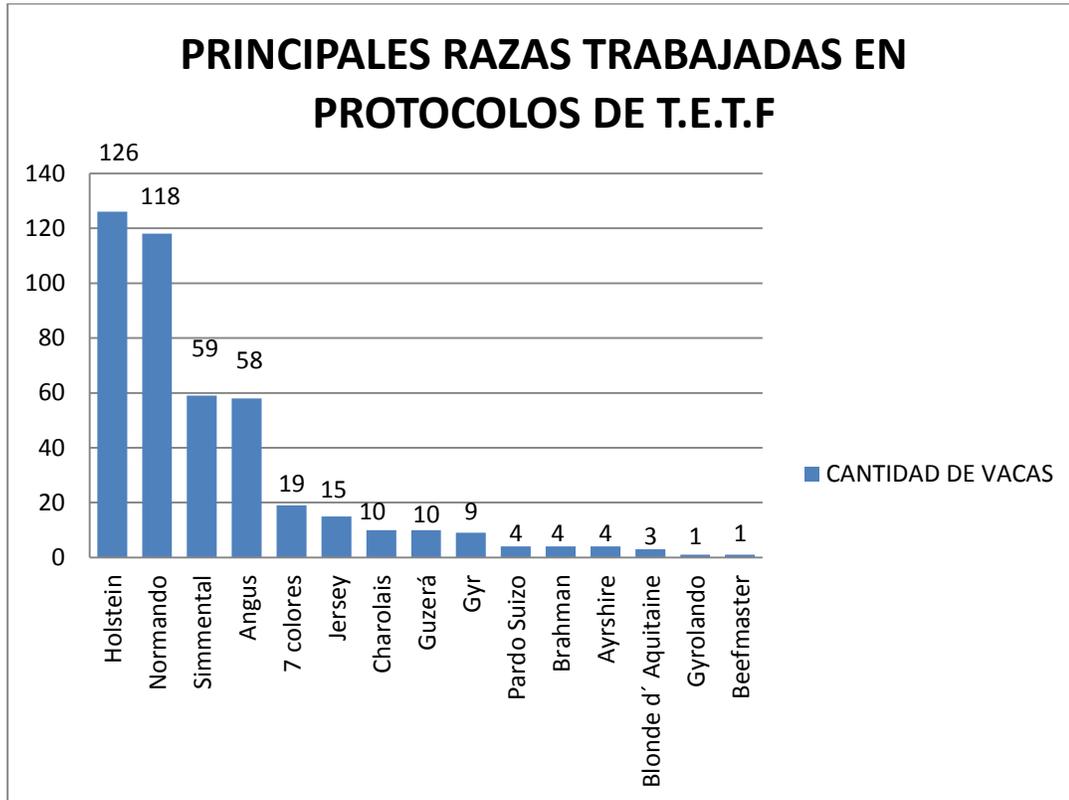
Los protocolos de tiempo fijo buscan sincronizar la onda folicular de varias donadoras y, por consiguiente, inician el tratamiento estimulador independientemente de la fase del ciclo estral en que estén. Estos protocolos se basan en la utilización de una mezcla de progesterona y estrógenos, o de GnRH. Con cualquiera de estos tratamientos se logra reiniciar la onda folicular. Con la utilización de estrógenos y progesterona, la onda folicular se reinicia a los 4 días y se considera que el tratamiento con FSH se debe iniciar en este momento. Con la utilización de GnRH el inicio de la onda es más rápido, y el tratamiento de FSH se debe iniciar 36-48h después de la GnRH. Los reportes no muestran ninguna ventaja entre E2/P4 y GnRH, y se debe considerar que el uso de estrógenos no es recomendado para animales de consumo. (7).

4.4 SELECCIÓN DE RECEPTORAS

Para la selección de las receptoras tendremos en cuenta las mismas consideraciones que se mencionaron en la parte de selección de donantes: edad, estado nutricional, estado reproductivo, estado sanitario y su valor genético. Estas contemplaciones más una muy importante, la habilidad materna, esta receptora deberá ser capaz de parir sin grandes dificultades y luego alimentar al ternero de manera que le permita expresar su potencial genético. En consecuencia, deberá ser de buen tamaño, tanto general como reproductivamente sana y de buena capacidad lechera. (11).

Cumpliendo con estas características tenemos una raza que ha figurado como la vaca receptora por excelencia, hay varias condiciones que hacen que la raza Normando sea elegida como vaca receptora en la mayoría de los protocolos de T.E.T.F realizados en el trópico alto. Dentro de esas condiciones tenemos su docilidad, su habilidad materna, su producción de leche, el precio exequible en comparación a otras razas y el gran número de animales existentes en el mercado. Por las anteriores razones se explica el gran número de animales de esta raza usados en protocolos de TETF y que la vemos reflejada en la siguiente figura:

Figura N° 6



Fuente: Reyes, 2016

En el desarrollo de las actividades como pasante en el área de mejoramiento reproductivo en la parte de hembra, se tomó nota de las principales razas las cuales se les hicieron diferentes procedimientos relacionados protocolos de T.E.T.F. y en base al análisis de estos datos se establecieron la figura anterior y las siguientes conclusiones.

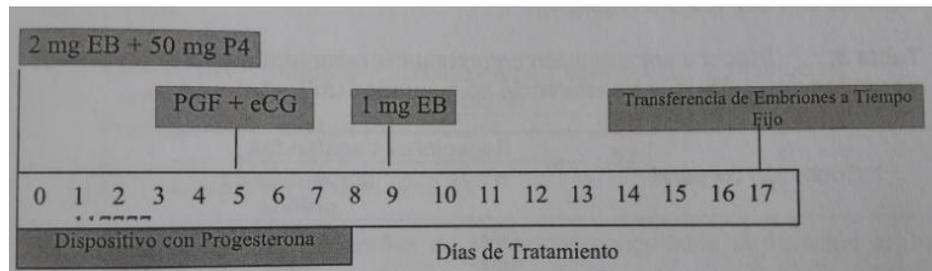
Por ser el campo de trabajo del Dr. Mauricio G fajardo Esp, encargado de los trabajos de transferencia de embriones, el sector de la sabana de Bogotá y el altiplanocundiboyacense, donde encontramos dos de los cordones lecheros más importantes del país, explica el gran número de vacas de raza holstein en la figura (), ya que esta es la raza lechera por excelencia estará sin reparo en la mayoría de los hatos lecheros del sector.

Las razas bos taurus por ser las razas que más se adaptan a las grandes alturas, son las que aparecen en mayor número en los datos analizados, dentro ellas tenemos la raza holstein, la raza simmental y la raza Angus. Si por el contrario el sector de trabajo del Dr. Mauricio G Fajardo fuese sectores del trópico bajo como

los llanos orientales, las razas que más presencia tendrían serían las razas bos indicus.

4.5 PROTOCOLO RECEPTORAS

Figura N°7



Protocolo de tratamiento hormonal de receptoras en programas de transferencia de embriones a tiempo fijo en vacas receptoras. El tratamiento consiste en la inserción de un dispositivo con progesterona y la administración de benzoato de estradiol (EB) im con progesterona (P4) en el día 0, PGF y 400 UL de eCG en el día 5, remoción del dispositivo en el día 8, y EB en el día 9. No se detecta celo y la transferencia se realiza en el día 17; las receptoras con un CL>10 mm reciben un embrión. Fuente: Especialización Reproducción bovina. Fisiología de la reproducción de la vaca, IRAC, CGR, universidad de córdoba. 2016.

Tabla N° 7 Protocolo receptoras

Día	Fecha	Hora	Actividad
MARTES	18 - oct - 16	10:00 a.m.	DIB ® + 2 ml de SINCRODIOL ® im
DOMINGO	23 - oct - 16	10:00 a.m.	SINCROCIO® 2 ml, im + FOLLIGON® 2ml, im
MIÉRCOLES	26 - oct - 16	10:00 a.m.	Retiro DIB ®
JUEVES	27- oct - 16	10:00 a.m.	SINCRODIOL ® 1,0 ml, im
VIERNES	28 - oct - 16	10:00 a.m.	Observar celos
VIERNES	28 - oct - 16	10:00 a.m.	
VIERNES	04- nov- 16	10:00 a.m.	Transferencia de embriones

Fuente: Mauricio G Fajardo Esp, 2016

4.6 RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

4.6.1 PROCEDIMIENTOS Y CONSIDERACIONES PREVIOS A LA TÉCNICA

Deberá tenerse en cuenta la limpieza escrupulosa y la utilización de guantes plásticos descartables por parte del recolector y para cada donante, a fin de asegurar que no se transmita el material infeccioso a otra donante.

De más está decir, que se deberá ser precavido durante el proceso de recolección para no dañar los órganos genitales de la donante. El exceso de inflado o llenado del balón del catéter de lavaje puede llegar a destruir el endometrio o desgarrar la pared del útero. Asimismo, la excesiva manipulación del útero y/o la tracción sobre el catéter puede causar hemorragia uterina. (10).

Deberá registrarse el volumen del fluido vertido y el recobrado. El dejar de recobrar la mayoría del fluido indicaría aplicar una técnica incompleta y podría causar el fracaso de la recuperación de embriones. Si se utiliza la filtración directa de fluidos de lavaje para la extracción de embriones, los filtros deberán ser manejados con gran precaución, siguiendo las instrucciones específicas provistas por el fabricante del filtro (9).

4.6.2 SUJECIÓN

La sujeción de la donante no deberá ser estresante o abusiva. Será necesario un control adecuado para consolidar la seguridad del operario y de sus colaboradores y minimizar el movimiento excesivo durante la recolección de embriones. Los sedantes o tranquilizantes deberán ser suministrados prudentemente y de acuerdo con los procedimientos permitidos. (9).

Foto N° 16 SUJECIÓN EN BRETE



Sujeción de vaca donante de embriones durante recolección de embriones por método convencional. Fuente: Reyes, 2016

4.6.3 DESINFECCIÓN DE INSTRUMENTOS Y LIMPIEZA DE DONANTE

La vulva y la cola deberán ser frotadas con un antiséptico, y luego enjuagadas adecuadamente. La anestesia epidural deberá administrarse cuidadosamente (lidocaína 2%, 4 cm) (14), con particular atención de la zona de aplicación, anestésico a utilizar, concentración y dosis del mismo.

Todo equipo de recolección de embriones, que está en contacto con la donante o con sus secreciones o excreciones, deberá ser desinfectado o de lo contrario utilizar un nuevo equipo para cada animal. En particular, los tubos, catéteres, placas y envases de recolección, etc., que tienen contacto directo con el medio uterino, no deberán usarse para más de un donante sin ser esterilización previa (8).

4.6.4 PROCEDIMIENTO

En primer lugar se debe hacer la palpación de los ovarios para determinar si la vaca tuvo una respuesta o no, a la palpación se podrán palpar los numerosos cuerpos lúteos si la vaca respondió satisfactoriamente al protocolo de superovulación, enseguida se vaciara el contenido rectal y se continuará con la anestesia epidural (9). La anestesia epidural se hace con el fin de facilitar la manipulación de útero de la vaca, esta se realiza en el espacio intervertebral que divide la primer y segunda vertebra coccígea. Lo ideal sería depilar la zona y

posteriormente introducir una aguja de 24" y se hace en posición de 45 ° esta anestesia se realiza con lidocaína (2%), para asegurarnos de que la aguja está en el interior del canal vertebral se aplicarán algunas gotas de anestésico en la aguja y si está correctamente ubicada serán aspiradas hacía el interior. Como prueba final del bloqueo será evidente la flacidez de la cola y la falta de respuesta del esfínter anal (10).

Foto N° 17 SONDA FOLEY



Paso de sonda Foley por medio de estilete durante una colecta de embriones en vaca de raza Pardo Suizo. Fuente: Reyes, 2016

Para el Procedimiento de lavado o colecta de embriones el Dr. Mauricio G Fajardo Esp, implementa el método de circuito cerrado con flujo continuo; con este método se emplean catéteres de 3 vías, rígidos o flexibles. Una vía destinada a la inyección del medio de lavaje, se conecta al frasco que contiene la solución por medio de un conducto de goma látex o silicona. La solución puede inyectarse por gravedad, colocando el frasco con el medio a aproximadamente un metro por encima del frasco recolector o con una jeringa, por la segunda vía se inyecta aire o medio para llenar el balón y por medio de una tercera vía se recolecta la solución de lavaje, sin interrumpir la descarga (12.)

4.7 OBTENCIÓN Y BUSQUEDA DE EMBRIONES

Es esencial, antes de la recolección de los embriones, una adecuada preparación del área de trabajo tanto en el caso de un laboratorio fijo, de uno móvil o el de un

establecimiento ganadero. Con los programas en la estación de transferencia, el laboratorio debe estar diseñado y mantenido adecuadamente para disponer del control sobre la temperatura, saneamiento, circulación del aire, iluminación circulación del personal.

Foto N° 18 LABORATORIO MÓVIL

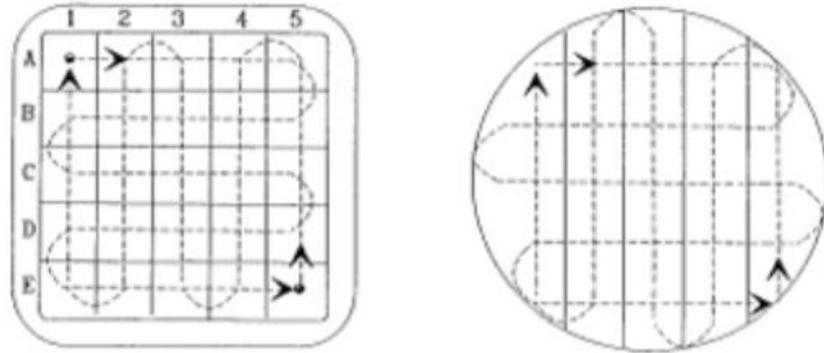


Laboratorio móvil para la búsqueda de embriones, de izquierda a derecha: estereomicroscopio, cajas de Petri, medio de mantenimiento de embriones, micropipeta. Fuente: Reyes, 2016

Luego del lavado por medio circuito cerrado con fluido continuo, se aíslan los embriones por medio de filtración del medio recuperado. Actualmente se emplean filtros estériles con malla de acero inoxidable o plástico de 60-90 micras de diámetro de poro. Estos se pueden presentar en recipientes con forma de embudo, donde se vuelca el medio recolectado del frasco (después del lavaje) o directamente del catéter (durante el lavaje). También existe en la actualidad un envase miniflush – minitube que es capaz de regular él mismo la salida y entrada del medio de lavado (11).

El volumen de solución conteniendo los embriones (40-50 ml) se vuelca en 4-5 vidrios de reloj o en 2-3 placas de Petri (de 130 mm de diámetro) con divisiones. Para garantizar una completa observación visual de la superficie total de la placa, la búsqueda deberá hacerse en forma de guarda griega, tanto en el sentido de las abscisas como de las ordenadas (orientándose de acuerdo a la disposición de los cuadrados. Para ello existen en el mercado placas cuadrículadas, el cuadrículado puede trazarse, además, en las placas plásticas con un marcador fino indeleble o una aguja hipodérmica, en la parte externa del piso como también en la tapa, colocando ésta bajo la placa durante la búsqueda. (11).

Figura N°8



Se indica en qué dirección se debe hacer la búsqueda de los embriones. Fuente: recolección de los embriones G. A. Palma

Los embriones encontrados deberán ser transportados a una placa de Petri más pequeña (3 mm) o a una placa de cuatro celdas Nunc, con medio enriquecido con suero. Esta operación deberá repetirse a fin de lavar los embriones antes de la transferencia o de la congelación, según lo establecido en el reglamento de la IETS.

Foto N°19 FILTRO MINITUBE - MINIFLUSH



Lavado del filtro Minitube – Miniflush con medio de mantenimiento, se vierte el contenido del filtro sobre una caja de Petri con cuadrícula para facilitar la búsqueda de los embriones. Fuente: Reyes, 2016

La búsqueda y evaluación de los embriones no sólo requiere de microscopios estereoscópicos con buenas ópticas sino también de una buena superficie de apoyo, a fin de evitar accidentes con las placas.

Foto N° 20 ESTEREOMICROSCOPIO Y MESA DE APOYO



Estereomicroscopio marca Nikon y mesa de apoyo con campo estéril, puntas de micropipeta y medio de mantenimiento de embriones COMPLETE FLUSH®.

Fuente: Reyes, 2016

4.8 EVALUACIÓN Y CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA

La clasificación y evaluación de los embriones son sin duda los procedimientos más difíciles para aquellos técnicos y profesionales que comienzan a trabajar con esta biotecnología reproductiva. En realidad, no es algo complejo sin embargo se requiere habilidad y experiencia. A continuación, se exponen para los interesados los aspectos más relevantes de estos dos procedimientos.

Un oocito mide aproximadamente 150-190 μ m y tiene una zona pelúcida de aproximadamente 12-15 μ m. Este diámetro permanece sin variaciones considerables desde que tiene una célula hasta que se encuentra en fase de blastocisto expandido. El técnico puede contar las células del embrión sin dificultad hasta que este tiene 16 células, luego de esto, las células se dividen asincrónicamente e identificarlas se hace un poco difícil. Cuando las células comienzan a adherirse entre ellas y comienzan a perder su forma esférica el embrión recibe el nombre de mórula (11).

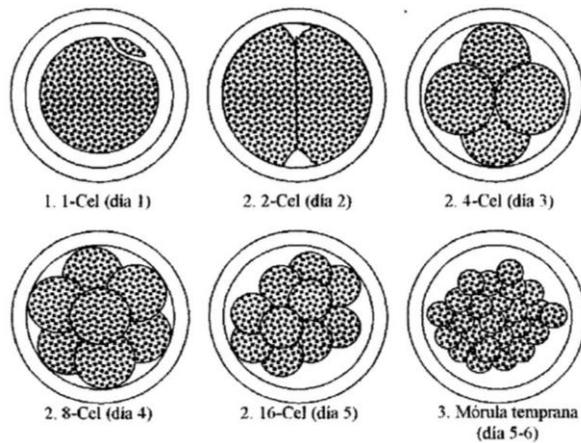
Figura N°9

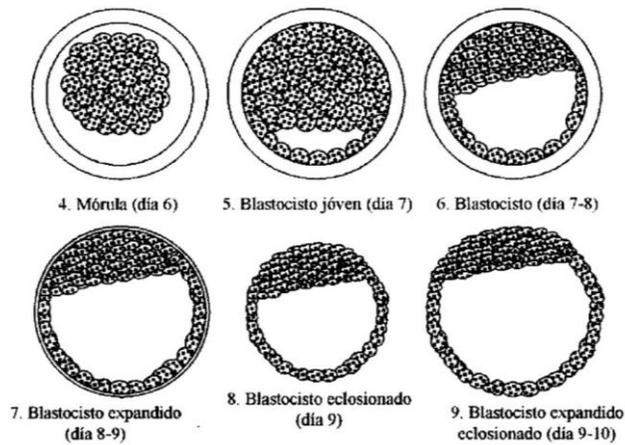


Partes de un embrión; en la imagen anterior observamos: 1. Zona pelúcida; 2. Masa celular; 3 espacio previtelino. Fuente: Jairo S. clasificación y calificación de embrionaria

Los estados de desarrollo del embrión se identifican, después de tener 16 células, de acuerdo al desarrollo morfológico.

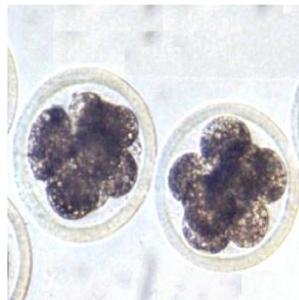
Figura N°10





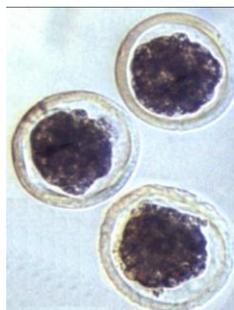
Estadios de desarrollo embrionario. Fuente: Rumualdo gonzalez. Procedimientos en los programas de trasplante de embriones bovinos. 2015

Figura N° 11



Mórula (Estadio 4): Las células (blastómeras) son difíciles de distinguir unas de otras. El embrión tiene aproximadamente 5 días. Fuente: Marco A Aspirón

Figura N°12



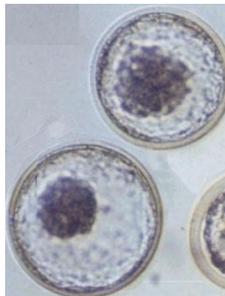
Mórula compacta: Las blastómeras se juntan y forman una masa celular sólida. El embrión ocupa aproximadamente un 60% del espacio perivitelino. Fuente: Marco A Aspirón

Figura N°13



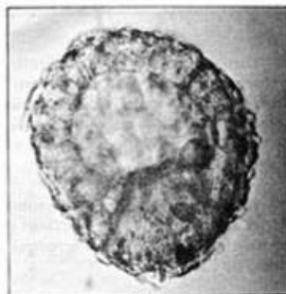
Blastocisto temprano (Estadio 5): Presenta una cavidad en donde se encuentra un fluido llamado blastocele. El embrión ocupa el 70-80% del espacio perivitelino. Se puede diferenciar el trofoblasto y el macizo celular interno. Luego de esta etapa viene el Blastocisto (Estadio 6) propiamente dicho. La única diferencia entre estos dos estados es básicamente el tamaño de la cavidad. Fuente: Marco A Aspirón

Figura N° 14



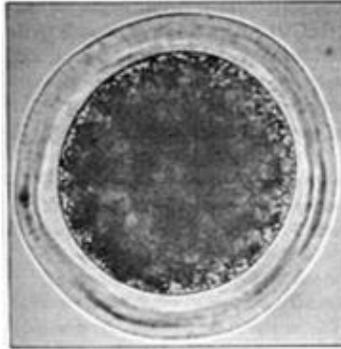
Blastocisto expandido (Estadio 7): El diámetro aumenta hasta en un 150%. La zona pelúcida se adelgaza hasta en un 66% con respecto al grosor que tenía en el Estado 4. Estos embriones tienen una edad estimada de 8 a 9 días. Fuente: Marco A Aspirón

Figura N° 15



Blastocisto eclosionado (Estadio 8): La masa celular puede estar por fuera de la zona pelúcida o en proceso de salir. Luego viene un estado llamado **Blastocisto eclosionado expandido** (Estadio 9). Fuente: Marco A Aspirón

Figura: N° 16



Los **embriones infertilizados** los identificamos porque su interior es un óvalo bien delimitado y al observarlo detenidamente vemos que ése interior está compuesto no por bordes (segmentos) sino por gránulos (estructura de puntillismo). Fuente: Marco A Aspirón

4.9 EVALUACIÓN

Si en la clasificación utilizáramos una escala numérica del 1 al 9 en la evaluación vamos a utilizar una escala numérica que va del 1 al 4:

Calidad 1: Embriones excelentes y buenos. Son embriones esféricos, simétricos con células de tamaño, color y texturas uniformes. Puede haber pequeñas imperfecciones como algunas blastómeras sueltas, tamaño irregular o algunas vesículas. Estos embriones son los ideales para congelar.

Calidad 2: Embriones regulares. Tienen problemas más definidos incluyendo blastómeras sueltas, vesículas o células degeneradas. Estos embriones pueden ser congelados, pero se obtendrán resultados bajos. Sin embargo, son embriones aceptables para ser transferidos en fresco (de donadora a receptora directamente sin congelación).

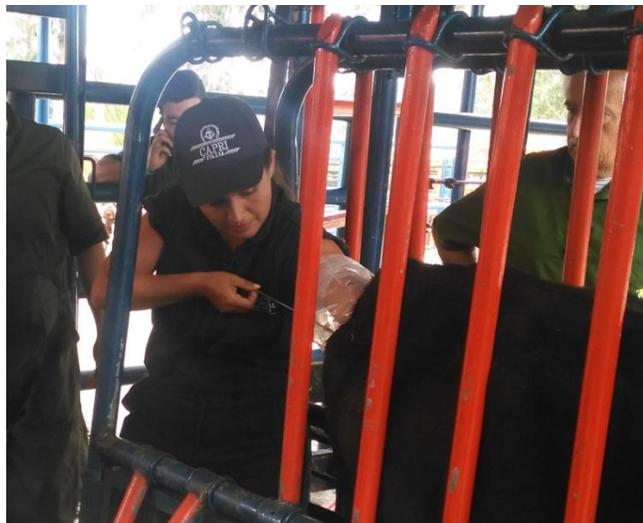
Calidad 3: Embriones malos. Numerosas blastómeras sueltas, células degeneradas. Células de distinto tamaño, color y textura, formas irregulares. Numerosas vesículas. No se deben congelar y al ser transferidos en fresco nos dan resultados pobres.

Calidad 4: Muertos o degenerados. Son embriones cuyas blastómeras se encuentran en desorden y sueltas. Hay muchas vesículas. Puede tener un aspecto granular como los infertilizados y tener un crecimiento retardado con respecto a los otros embriones de la colecta. No se congelan ni se transfieren en fresco. (11)

4.10 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

El desarrollo de la transferencia de embriones fue paralelo al de la recolección. Cuando los embriones fueron recolectados 5-7 días después del estro por medio de cirugía y bajo anestesia general, las receptoras fueron preparadas para la 28 transferencia bajo las mismas condiciones que las donantes. En un esfuerzo por eliminar los problemas asociados con la anestesia general, sin alterar la eficacia de la recolección quirúrgica, algunos grupos cambiaron hacia el uso de la anestesia local. Esta variante fue aplicada inmediatamente a las receptoras. Su empleo exitoso permitió que se siga utilizando en la práctica. Los resultados obtenidos empleando la transferencia no quirúrgica se aproximan a los obtenidos con el método quirúrgico, razón por la cual esta última técnica tiene actualmente pocos usuarios. (13).

Foto N°21 PISTOLA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES



Paso de pistola de transferencia de embriones vía cérvix – útero – cuerno uterino.
Fuente: Reyes, 2016

4.11 TRANSFERENCIA NO QUIRÚRGICA

Es la técnica de elección en la actualidad. La primera transferencia no quirúrgica con éxito en bovinos fue lograda por MUTTER en 1964, atravesando el cérvix con una pipeta de inseminación. El éxito fue precedido, sin embargo, de muchos fracasos como consecuencia, aparentemente, de infecciones y contracciones uterinas provocadas en el intento. Los envases para los embriones y los instrumentos empleados en la transferencia son de diverso material y tamaño, el

lugar de elección para obtener resultados aceptables es por delante del ligamento intercornual (13).

Foto N° 22 MATERIALES PARA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES



Servilletas, fundas de transferencia, estilete de transferencia de embriones, fundas sanitarias, termo, termómetro, alcohol, agujas, lidocaina, libro transferencia de embriones. Fuente: Carlos Reyes, 2016.

4.12 CONSERVACIONES DE EMBRIONES

Los embriones bovinos son recolectados en una solución salina buffer fosfato (PBS Dulbecco) suplementada con 1% de suero o 0,1% de albúmina sérica (PBSS). A medida que los embriones son localizados bajo la lupa estereoscópica, se los coloca en PBSS con un porcentaje mayor de suero (10 o 20%) o albúmina 4%. Permanecen en este medio, a la temperatura del laboratorio 20-25°C hasta que se realiza la transferencia o se lleva a cabo otra manipulación, Los embriones pueden ser conservados in vitro para su posterior transferencia mediante: Cultivo a 37° C, refrigeración entre 0o C y 4o C o congelación a -196oC (13).

4.13 CONGELACIÓN A -196°C

Es la técnica de elección para conservar embriones. Se considera que los embriones pueden ser mantenidos a -196°C durante doscientos años o más, sin 30 afectar su viabilidad y sin causarles cambios genéticos. Este hecho, convierte a la congelación de embriones en una herramienta insustituible para el comercio internacional de reproductores. Por su parte, los porcentajes de preñez resultantes de la transferencia de embriones congelados son inversamente proporcionales al

tiempo transcurrido desde la recolección hasta el comienzo de la congelación; la viabilidad embrionaria disminuye significativamente cuando dicho período es mayor de tres (3) horas (10)

Los embriones pueden ser conservados a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando el método de congelación standard, la vitrificación o el método de congelación rápida. La principal diferencia que tiene el método de congelación standard con respecto a los otros es que, en él, el descenso de temperatura se efectúa de manera controlada utilizando equipos programables (10).

Foto N° 23 CONGELADORA DE EMBRIONES



Fuente: Carlos Reyes, 2016

Este método posibilitó obtener el primer ternero nacido de la transferencia de un embrión congelado en 1973. Al método standard se le han efectuado desde entonces distintas modificaciones tendientes a su simplificación; en la actualidad, los embriones son congelados y descongelados de manera rápida. Las pajuelas o 31 pajillas de 0,25 ml constituyen el envase de elección porque tienen menor tamaño, paredes más delgadas y menor volumen que las ampollas y los tubos. (7).

Figura N° 17



a) Empacado de embriones con ayuda de Estereomicroscopio, b) embriones colocados en la congeladora, marcados y sellados. Fuente: Humberto tribulo, irac

Pueden ser colocados los embriones en el equipo de congelación a la temperatura a la que se efectúa el seeding (aproximadamente $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$). Es conveniente en este caso que transcurra cinco minutos para que se equilibre la temperatura de las pajuelas con la del equipo de congelación, posteriormente el maqui computarizada disminuye la temperatura a razón $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto hasta llegar a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ (13).

5. CONCLUSIONES

- Realizar la pasantía en la empresa CGR BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA S.A.S desarrolla óptima formación integral del estudiante, permitiendo crecer en habilidades prácticas y conocimientos en el campo de la medicina veterinaria en la especialidad de reproducción bovina.
- El uso de las biotecnologías reproductivas en la producción bovina ha incrementado y fortalecido en el sector ganadero, debido a que facilita el mejoramiento genético de esta especie y además previene la transmisión de enfermedades reproductivas, factores que motivan a la producción de mejores hatos.
- La capacitación y orientación brindada por los médicos veterinarios de la empresa en diversas labores logran amplios conocimientos en protocolos de inseminación artificial a término fijo, superovulación, colecta, transferencia y congelación de embriones bovinos, métodos de criopreservación de semen bovino, evaluación y selección de toros, siendo las biotecnologías reproductivas más utilizadas en el mercado ganadero y además de gran importancia para los sistemas de producción bovina en Colombia.
- El éxito de los programas de reproducción depende de muchos factores como manejo nutricional, plan sanitario, administrativo, instalaciones y disponibilidad de personal para obtener mejores resultados.

6. RECOMENDACIONES

- Implementar registro para el pasaje, vitaminización y purga de los animales.
- Zona apta para almacenar los cabezales, lazos y nariguera diferente a la habitación de botiquín.
- Adquirir una mesa de cirugía para bovinos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Marcela Rodríguez, Adriana Vallejo, Paula Batista, Ana C. Espasandin. Biotecnologías reproductivas aplicadas a la mejora genética animal, revista changü N°31, octubre 2011.
2. Fisiología de la reproducción del toro y evaluación de la capacidad reproductiva, métodos de colección de semen, IRAC, 2012.
3. A Ribeiro-Peres, L Munita-Barbosa, M Yumi-Kanazawa, MI Mello-Martins, F Ferreira de Souza, Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado, Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, UNESP, Jaboticabal, Brasil. Scielo, 2014.
4. Luis Ferré y Luciano Cattaneo. Biotecnologías reproductivas: producción in vitro de embriones y semen sexado, Rev. Med. Vet. (B. Aires) 2013.
5. R. Muiño et al. ITEA (2005), Vol. 101 (3), 175-191. Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. Departamento de Patología Animal. Reproducción y Obstetricia. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo
6. Escamilla, Ana Ruby (2005) Aplicación de clorhidrato de xilacina (0.05 mg/kg) en toros como facilitador de la colecta de semen con el método de electroeyaculador. Licenciatura thesis, Universidad de San Carlos de Guatemala.
7. Boris Javier Brito Pintado. MANEJO DE RECEPTORAS EN PROGRAMAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES A TIEMPO FIJO, Universidad de cuenca, 2014
8. Jiménez C, Superovulación: ESTRATEGIAS, FACTORES ASOCIADOS Y PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA EN BOVINOS. Universidad nacional de Colombia. 2009.

9. Especialización Reproducción bovina. Fisiología reproductiva de la vaca, IRAC, CGR, universidad de Córdoba. 2016.
10. Rumualdo González. Procedimientos en los programas de trasplante de embriones en bovinos, venezolana de inseminación artificial y trasplante de embriones. Capítulo XXV. 2015
11. Palma, G. A. 2008. Recolección de los embriones bovinos. Biotecnología de la Reproducción. Rebiotec, Segunda Edición. Pág. 109-124.
12. Cutini, A., Teruel, M., & Cabodevila, J. 2000. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. Revista Taurus, 2(8), 35-47.
13. Fabricio Rasi de Almeida Prado. Reproducción Animal Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNESP. Botucatu-SP. 2005.
14. Moscuza, C., Becaluba, M. Anestésias loco-regionales en el rumiante, 2015