

**DIAGNOSTICO DE PARÁMETROS TÉCNICOS EN LA EMPRESA VITA IVF LAB
PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS *IN VITRO* EN LA
CIUDAD DE BOGOTÁ, COLOMBIA.**

**TRABAJO FINAL PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE ZOOTECNISTA**

**KERLY ROXANA VELAZCO PINTO
CÓD: 557.383**

**TUTOR(A)
CÉSAR AUGUSTO PORTILLA LUNA**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ZOOTECNIA
VILLA DEL ROSARIO
2020**

ÍNDICE

Capítulo 1. Diagnóstico de parámetros técnicos en la empresa Vita IVF Lab para la producción de embriones bovinos <i>in vitro</i> en la ciudad de Bogotá, Colombia.	1
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Formulación del problema	2
1.3 Objetivos	2
1.3.1 Objetivo General.	2
1.3.2 Objetivos Específicos.....	3
Capitulo 1. Diagnóstico de parámetros técnicos en la empresa Vita IVF Lab para la producción de embriones bovinos <i>in vitro</i> en la ciudad de Bogotá, Colombia.	2
1.4 Justificación	3
Capítulo 2. Marco Referencial.....	5
2.1 Antecedentes	5
2.2 Marco Contextual.....	8
2.2.1 Generalidades de la empresa Vita IVF Lab ubicada en Bogotá, Colombia.....	8
2.3 Marco Teórico.....	10
2.3.1 Transferencia de embriones	10
2.3.2 Selección de donadoras	11
2.3.3 Gestión de las donadoras.....	13
2.3.3.1 Protocolos de sincronización	14

a) <i>Progesterona o progestágenos.</i>	14
b) <i>Tratamiento de donadoras bovinas con CIDR</i>	14
2.3.3.2 Superovulación	15
2.3.3.2.1 Factores que intervienen en la respuesta de la ovulación múltiple.	17
a) <i>Factor Hormona</i>	17
b) <i>Factor Nutrición</i>	17
c) <i>Factor raza</i>	19
d) <i>Factor edad</i>	20
e) <i>Factor clima</i>	21
2.3.4 Recolección de ovocitos (OPU)	21
2.3.4.1 Aspiración transvaginal guiada por ultrasonido.	21
2.3.4.2 Búsqueda de ovocitos.	24
a) <i>Ovocito G1</i>	27
b) <i>Ovocito G2</i>	28
c) <i>Ovocito G3</i>	28
d) <i>Ovocito desnudo</i>	29
e) <i>Ovocito con citoplasma irregular</i>	29
2.3.5 Desarrollo embrionario	30
2.3.5.1 Calidad embrionaria.....	32
2.3.5.2 Clasificación de los embriones	32

a) <i>Mórula (Mo)</i>	32
b) <i>Mórula compactada (Mc)</i>	33
c) <i>Blastocisto temprano (Bt)</i>	33
d) <i>Blastocisto (Bx)</i>	34
e) <i>Blastocisto expandido (Be)</i>	34
f) <i>Blastocisto eclocionado (Bp)</i>	35
2.3.5.3 Códigos para la calidad del embrión.....	35
a) <i>Código 1 - Excelente o bueno</i>	35
b) <i>Código 2 – Justo</i>	36
c) <i>Código 3 – pobre</i>	36
d) <i>Código 4 - Muerto o degenerado</i>	37
2.3.6 Selección de receptoras.....	37
a) <i>Fenotipo</i>	38
b) <i>Palpación</i>	38
c) <i>Sangrar los vientres</i>	38
2.3.7 Procedimiento de transferencia de embriones a receptora.....	38
2.3.7.1 Protocolo de descongelación para embriones congelados en glicerol.....	39
2.4 Marco Legal.....	40
2.4.1 RESOLUCION ICA 20033 de 2016.....	40
Capítulo 3. Diseño Metodológico.....	41

3.1 Tipo de investigación	41
3.2 Población y muestra	42
<i>a) Población</i>	42
<i>b) Muestra</i>	42
3.3 Actividades desarrolladas	42
<i>a) Actividades a nivel de laboratorio</i>	42
<i>b) Actividades a nivel de campo</i>	43
<i>c) Actividades a nivel de oficina</i>	43
Capítulo 4. Administración del proyecto	45
4.1 Recursos humanos	45
4.2 Recursos institucionales	45
Capitulo 5. Resultados y discusión	46
5.1 Objetivo 1	46
5.1.1 <i>Meta</i>	46
5.1.2 <i>Actividades</i>	46
5.1.3 Resultados	47
<i>a) Área principal de oficina</i>	47
<i>b) Área de material de campo</i>	48
<i>c) Área de cilindros</i>	49
<i>d) Área de planta de energía</i>	51

e) <i>Área de recepción de pajillas de semen, almacenamiento de termo de nitrógeno y almacén de inventario</i>	51
f) <i>Área de filtros de seguridad</i>	53
g) <i>Área de laboratorio</i>	54
5.2 <i>Objetivo 2</i>	57
5.2.1 <i>Meta</i>	58
5.2.2 <i>Actividades</i>	58
5.2.3 <i>Resultados</i>	58
a) <i>Área de descongelación de pajillas</i>	58
c) <i>Área de producción</i>	61
d) <i>Área de incubadoras</i>	62
e) <i>Área de etiquetado</i>	64
f) <i>Área de empaquetado</i>	65
g) <i>Área de congelación de embriones</i>	66
h) <i>Área de almacenamiento de embriones congelados</i>	67
5.3 <i>Objetivo 3</i>	68
5.3.1 <i>Meta</i>	68
5.3.2 <i>Actividades</i>	68
5.3.3 <i>Resultados</i>	69
a) <i>Recolección y maduración de ovocitos bovinos</i>	69

<i>b) Descongelación y adecuación de semen</i>	73
<i>c) Fertilización in vitro (FIV)</i>	75
<i>d) Cultivo in vitro (CIV)</i>	77
<i>e) Clivaje (D4)</i>	82
<i>f) Empaquetado y congelación de embriones</i>	84
5.4 Actividades adicionales	90
5.4.1 Actividades	90
5.4.2 Resultados	91
<i>a) Precios de embriones congelados y en fresco</i>	91
<i>b) Diagnostico productivo</i>	91
<i>c) Análisis DOFA</i>	96
Capítulo 6. Conclusiones	98
Capítulo 7. Recomendaciones.....	99
Capitulo 8. Referencias.....	100

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Matriz Dofa de la Empresa Vita IVF Lab..... 100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 . Protocolo de sincronización y superovulación con CIDR (Suaznabar & Maribel, 2018).	15
Figura 2. Implementos de protocolo de sincronización (Autor, 2018)	15
Figura 3. Superovulación vs. Ciclo estral regular (Antonio, 2017)	16
Figura 4. Condición corporal bovina (Ahedo, 2017)	18
Figura 5. Comparación de ovocitos raza indicus y taurina (Autor, 2020)	20
Figura 6. Partes y posición del transductor dentro de la vaca (Sedena, 2005).....	22
Figura 7. Colocación del transductor y el ovario para aspiración folicular (Nava, Hernandez, & Hugo, 2005)	23
Figura 8. Folículos vistos a través del equipo de ultrasonido (Autor, 2020)	24
Figura 9. Implementos para la búsqueda de ovocitos (Autor, 2020)	25
Figura 10. Partes de un ovocito (Autor, 2020).....	27
Figura 11. Ovocito G1 (Autor, 2020).....	28
Figura 12. Ovocito G2 (Autor, 2020).....	28
Figura 13. Ovocito G3 (Autor, 2020).....	29
Figura 14. Ovocito Desnudo (Autor, 2020)	29
Figura 15. Ovocito con citoplasma irregular (Autor, 2020).....	29
Figura 16. Clivaje de un embrión (Carillo, Lenis, & Rodriguez, 2014)	30
Figura 17. desarrollo embrionario a partir de una mórula hasta llegar a un blastocisto expandido (Carillo, Lenis, & Rodriguez, 2014)	31
Figura 18. Formación del blastocisto eclosionado (Carillo, Lenis, & Rodriguez, 2014)	31
Figura 19. Mórula (Hansen, 2013).....	33

Figura 20. Mórula compactada (Hansen, 2013).....	33
Figura 21. Blastocito temprano (Hansen, 2013)	34
Figura 22. Blastocisto (Tambre, 2017)	34
Figura 23. Blastocisto expandido (Hansen, 2013)	35
Figura 24. Blastocisto eclosionado (Hansen, 2013).....	35
Figura 25. Embriones código 1 – excelente o bueno (Larson, 2016)	36
Figura 26. Embriones código 2 – justo (Larson, 2016).....	36
Figura 27. Embriones código 3 – pobre (Larson, 2016).	37
Figura 28. Embriones código 4 – muerto o degenerado (Larson, 2016).....	37
Figura 29. Introduciendo pajilla de embrión congelado en pistola de T.E. (Autor, 2020)	39
Figura 30. Descongelando pajilla de embrión congelado (Autor, 2020)	40
Figura 31. Oficina principal (Autor, 2020)	48
Figura 32. Estantes del área de material de campo (Autor, 2020)	49
Figura 33. Material que sale a campo (Autor, 2020)	49
Figura 34. Caseta de cilindros (Autor, 2020).....	50
Figura 35. Patio trasero (Autor, 2020)	50
Figura 36. Planta de energía de la empresa Vita IVF Lab (Autor, 2020)	51
Figura 37. Área de recepción de pajillas de semen, almacenamiento de termo de nitrógeno y almacén de inventario (Autor, 2020)	52
Figura 38. Mesa e implementos para la recepción de pajillas de semen (Autor, 2020).....	53
Figura 39. Primer filtro de seguridad (Autor, 2020)	54
Figura 40. Implementos de vestimenta para ingresar al laboratorio (Autor, 2020)	54
Figura 41. Área de laboratorio (Autor, 2020)	55

Figura 42. Pestaña principal del software myembryos (Autor, 2020)	56
Figura 43. Pestaña principal del app Vytelle – IVF (Autor, 2020)	56
Figura 44. Planilla de inventario de pajillas de semen (Autor, 2020).....	57
Figura 45. Etiquetas de lacradores y gobelets para embrión congelado (Autor, 2020)	57
Figura 46. Termo descongelador de pajillas e implementos adicionales (Autor, 2020).....	59
Figura 47. Centrifugadora e implementos adicionales (Autor, 2020).....	61
Figura 48. Botón espermático de pajilla sexada (Autor, 2020).....	61
Figura 49. Área de producción (Autor, 2020).....	62
Figura 50. Área de incubadoras (Vita, 2019).....	63
Figura 51. Valores de las incubadoras (Vita, 2019).....	63
Figura 52. Área de etiquetado (Autor, 2020)	64
Figura 53. Gobelets, lacradores y etiqueta (Autor, 2020).....	65
Figura 54. Área de empaquetado (Autor, 2020)	66
Figura 55. Área de congelación de embriones (Autor, 2020).....	67
Figura 56. Área de almacenamiento de embriones (Autor, 2020).....	68
Figura 57. Placas de búsqueda A y B (Autor, 2020).....	72
Figura 58. Ovocitos madurados (Autor, 2020)	72
Figura 59. Criotubo con medio de maduración (Autor, 2020).....	73
Figura 60. Placas de 100mm y placas de 35mm del FIV (Autor. 2020).....	77
Figura 61. Cigotos antes del pipeteo (Autor, 2020).....	79
Figura 62. Cigotos después del pipeteo (Autor, 2020).....	79
Figura 63. Cigotos en la primera gota, medio de lavado (Autor, 2020)	80
Figura 64. Cigotos en la última gota, medio de cultivo (Autor, 2020)	80

Figura 65. Placas de cultivo (Autor, 2020)	81
Figura 66. Placas de clivaje (Autor, 2020).....	83
Figura 67. Embriones en los primeros estadios entre 8 a 16 células (Autor, 2020).....	84
Figura 68. Planilla de congelación de embriones (Autor, 2020).....	86
Figura 69. Placa de 100mm para congelación (Autor, 2020).....	87
Figura 70. Embriones en la placa de 100mm para congelación (Autor, 2020).....	87
Figura 71. conformación de pajilla para congelación de embriones (Autor, 2020).....	88
Figura 72. Seeding (Autor, 2020)	89
Figura 73. Embriones bovinos (Autor, 2020)	92
Figura 74. Fachada externa de la empresa Vita IVF Lab (Google Maps, 2020)	92
Figura 75. Vista satelital de la empresa Vita IVF Lab (Google Maps, 2020).....	93
Figura 76. Porcentajes de producción (Autor, 2020)	94
Figura 77. Limpieza de termos de almacenamiento (Autor, 2020).....	97
Figura 78. Embriones perdidos por caerse al fondo del termo (Autor, 2020).....	97

Resumen

El presente proyecto de pasantía se centró en evaluar los diferentes procesos que emplea la empresa Vita IVF Lab para la producción de embriones bovinos in vitro, dicha evaluación se realizó a través de la observación y participación en las diferentes actividades que realiza la empresa.

Los embriones se producen a partir de los ovocitos obtenidos por aspiración folicular en vacas vivas en los predios de los clientes, luego de la búsqueda y clasificación de los ovocitos, estos son introducidos en unos criotubos que contienen medio de maduración para que los ovocitos en 24 horas logren madurar a óvulos y posterior a ello los óvulos son fertilizados con semen bovino previamente seleccionado por el productor; luego de 22 horas después de la fertilización de los óvulos, estos pasan a ser conocidos como cigotos y entran en la fase de cultivo, en donde se revisa cuales óvulos fueron fertilizados correctamente y lograron avanzar a la etapa de cigoto pasándolos a unas placas especiales que contienen medio de cultivo que le proporciona al cigoto todos los nutrientes que necesita para seguir desarrollándose; tres días después de realizar el cultivo, se procede a realizar el clivaje, en dicho proceso el objetivo principal es observar cuales cigotos lograron realizar correctamente la divisiones en forma de blastómeros y pasa a denominarse embrión en sus primeros estadios de división celular, dichos embriones se separan de los que no lograron dividirse correctamente y se dejan en la incubadora durante tres días más hasta el momento de la congelación.

Al finalizar la pasantía, se logró concluir que los procesos empleados por la empresa permite disponer de un gran número de embriones bovinos en diferentes estadios de desarrollo los cuales son destinados para la venta en fresco o congelado.

Palabras clave: Ovocito, maduración *in vitro*, fertilización *in vitro* convencional, aspiración folicular, fecundación *in vitro*, colecta de ovocitos, clivaje, previsión.

Abstract

The present internship project focused on evaluating the different processes that the company Vita IVF Lab uses for the production of bovine embryos *in vitro*, this evaluation was carried out through observation and participation in the different activities carried out by the company.

The embryos are produced from the oocytes obtained by follicular aspiration in live cows on the clients' premises, after the search and classification of the oocytes, these are introduced into cryotubes containing maturing medium so that the oocytes in 24 hours they mature to ovules and after that the ovules are fertilized with bovine semen previously selected by the producer; after 22 hours after fertilizing the eggs, they become known as zygotes and enter the cultivation phase, where the eggs that were correctly fertilized are reviewed and they managed to advance to the zygote stage by passing them to special plates that they contain culture medium that provides the zygote with all the nutrients it needs to continue developing; three days after culture, cleavage is carried out, in this process the main objective is to observe which zygotes successfully carried out the divisions in the form of blastomeres and it is called an embryo in its first stages of cell division, these embryos are they separate from those that failed to divide correctly and are left in the incubator for three more days until the time of freezing.

At the end of the internship, it was concluded that the processes used by the company make it possible to have a large number of bovine embryos at different stages of development, which are intended for sale fresh or frozen.

Key words: Oocyte, *in vitro* maturation, conventional *in vitro* fertilization, follicular aspiration, *in vitro* fertilization, ovum pick up, cleavage, forecasting.

Introducción

Si se hace énfasis en la historia de la reproducción bovina, uno de los acontecimientos más relevantes en esta área fue la primera realización de una transferencia de embrión en esta especie, “fue reportada por Unbaugh en el año de 1949 y el nacimiento del primer becerro producto de la transferencia de embriones fue dos años después” (López, 2016). La realización de transferencia de embriones con todas las biotecnologías que estas implican, se empezó a emplear cuando el sistema de producción enfocada al ganado de doble propósito de Europa evoluciono hasta el punto de hacerse popular en Norte América, Australia y Nueva Zelanda, lo cual fue alrededor de la década de los 70. Inicialmente, las técnicas para transferir embriones de ganado eran exclusivamente quirúrgicas. Sin embargo, a principios de la década de 1980, la mayoría de los embriones se transfirieron sin cirugía (Jones, 2008).

En la actualidad, la producción de embriones *in vitro* se ha destacado como la practica biotecnológica más notable en el ganado bovino debido a las ganancias genéticas en los rebaños y al reflejar directamente la productividad del ganado ya sea en carne o leche. Estas biotecnologías reproductivas aliadas a los programas de mejora genética han surgido como una herramienta estratégica para impulsar la producción animal. Por lo tanto, este proceso ha dado como resultado una marcada selección genética, que ha reducido el intervalo entre generaciones y ha mejorado la productividad de los rebaños.

A consecuencia de lo anterior mencionado, la producción de embriones *in vitro* ha sido la técnica que más se ha expandido en los últimos años y que ofrece varias aplicaciones a escala

comercial; por ello esta técnica ha pasado a ser un instrumento fiable en la cría animal y su realización se ha convertido en rutina para profesionales que dedican su vida al campo como los médicos veterinarios y los zootecnistas.

Capítulo 1. Diagnóstico de parámetros técnicos en la empresa Vita IVF Lab para la producción de embriones bovinos *in vitro* en la ciudad de Bogotá, Colombia.

1.1 Planteamiento del problema

Para los ganaderos, una de las mayores problemáticas al poseer un ejemplar muy eficiente y de buen pedigrí, es el no poder aprovecharlo al máximo como se desea; el productor que tiene una vaca con altos niveles de valor genético desea aprovecharla al máximo, sin embargo, lo que se lo impide es el hecho de que esta solamente puede parir un becerro al año y a su vez tiene un número limitado de partos hasta que esta quede incapaz de seguir gestando.

El continuo deseo de los productores para solucionar esta problemática a un costo moderado produjo como resultado la creación de una nueva alternativa de reproducción conocida como la producción de embriones *in vitro*. (Sommantico, 2020)

La transferencia embrionaria es una herramienta a disposición de los productores ganaderos, que se destaca por aumentar la eficiencia del rodeo, logrando buenos índices reproductivos y permite obtener una mayor producción pero sobre todas las cosas, la implementación de esta tecnología permite acelerar la ganancia genética con la contribución de ambos sexos.

Debido a lo anteriormente mencionado, en Colombia varias empresas se dedican a la producción de embriones bovinos para lograr ofrecerle al mercado colombiano genética del más alto nivel y de una variedad de razas y cruces a medida de las necesidades de los productores. Cada una de las herramientas tecnológicas desarrolladas por las casas genéticas se enfoca en producir animales con alto valor genético y potencial productivo los cuales puedan ofrecer al ganadero un retorno rápido sobre su inversión y un salto significativo en lo que a selección y mejoramiento genético se refiere.

1.2 Formulación del problema

¿Son viables los parámetros técnicos empleados en la empresa Vita IVF Lab para la producción de embriones bovinos *in vitro* en la ciudad de Bogotá, Colombia?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General.

Diagnosticar los parámetros técnicos en la empresa Vita IVF Lab para la producción de embriones bovinos *in vitro* en la ciudad de Bogotá, Colombia.

1.3.2 Objetivos Específicos.

- Realizar un análisis de las técnicas y áreas utilizadas para la producción de embriones bovinos *in vitro*.
- Categorizar las áreas empleadas para la producción de embriones bovinos *in vitro*.
- Evaluar los diferentes procesos empleados para la producción de embriones *in vitro*

1.4 Justificación

La producción de embriones *in vitro* es una gran oportunidad de negocio en donde los productores que poseen animales muy eficientes y de buen pedigrí pueden sacarle provecho. Cuando un ganadero desea mejorar la calidad de sus animales, lo primero que se cruza por su mente es comprar genética la cual le aseguren que obtendrá ejemplares que incuestionablemente aumentaran los indicadores de producción en su predio, de ahí surge una nueva opción que ha obtenido mucha popularidad entre los productores de Colombia, la cual consiste en la compra y extracción de ovocitos para someterlos a fecundación *in vitro* en un laboratorio, un proceso el cual se ha utilizado mucho entre productores que desean obtener nuevas generaciones de ejemplares en mejores condiciones y con mejores rendimientos (Sánchez, 2013).

Según César Portilla Luna en una publicación realizada por CONtextoganadero expresa que apelar a la compra de embriones es una alternativa muy interesante, pues solo requiere que las hembras estén listas para que sea implantado el material proveniente del laboratorio. Además, permite que se hagan negocios entre predios para acceder a la genética (Portilla, 2016). Lo anterior mencionado nos da a entender que la producción de embriones *in vitro* es una gran alternativa para que los ganaderos logren obtener buena genética en sus hatos y al mismo tiempo es una buena alternativa de negocio para aquellas personas que deseen empezar a comercializar genética bovina entre los productores.

La producción de embriones *in vitro* a su vez es una de las alternativas más usadas en la actualidad por su bajo costo a comparación de otras técnicas similares como el método tradicional, en el cual es necesario suministrarle a las vacas hormonas para que estas logren producir una mayor cantidad de óvulos, implicando de esta forma más gastos para el productor, por ello la fecundación *in vitro* es una de las técnicas más llamativas en cuanto a genética se refiere, ya que esta permite obtener crías de excelente genética porque se tiene la facilidad de escoger tanto a las vacas donadora como al toro y de igual forma acortar el intervalo generacional y a su vez realizar mejoramiento genético a gran escala y con más rapidez. (Olaya, 2014)

Capítulo 2. Marco Referencial

2.1 Antecedentes

A lo largo del tiempo, se han realizado numerosos estudios e investigaciones con referencia en la producción *in vitro* de embriones, empezando desde animales marinos desde los años 1800 debido a que la fecundación se produce externamente al sistema reproductivo; hasta llegar finalmente a los bovinos, entre ellos está el caso de la investigación de María Elena Caso en donde explica uno de los primeros trabajos con éxito de embriología en animales marinos, en el cual dice “las primeras observaciones acerca de la fecundación del erizo de mar datan de un siglo, en el año de 1875 fue estudiada por Hertwig. Son clásicos también los estudios de fecundación, segmentación, desarrollo y metamorfosis realizados en *Arbacia punctulata*, por Jacques Loeb 1872 en la Estación de Biología Marina de Woods Hole.” (Caso, 1977).

Según Verónica Peláez (2011) El primer trabajo experimental sobre la embriología de mamíferos se llevó a cabo con conejos, a la vista de sus características biológicas favorables, tales como el tamaño relativamente grande del huevo, lo que facilita la manipulación, y la ovulación inducida por el apareamiento.

Por último, Wesley Whitten propuso una nueva formulación de los medios de cultivo, que se utiliza tanto en la recolección y el cultivo de embriones, aumentando significativamente el número de embriones implantados con éxito. Whitten ha desarrollado un medio con un bicarbonato de KrebsRinger, suplementado con albúmina de suero bovino, que fue capaz de

promover la división de un embrión de ratón con una célula a la fase de blastocisto. Junto con Whitten, Ralph Brinster comenzó una línea de investigación para determinar las necesidades nutricionales de un embrión durante el proceso de fertilización, por ello desarrolló la técnica de cultivo de embriones en microgotas, la cual se utilizan actualmente en varios laboratorios en el mundo, tanto en animales y humanos (Shelton, 2011)

Estas nuevas condiciones de cultivo, permite la expansión del desarrollo de técnicas para la producción de embriones *in vitro* y al pasar los años se fueron dando resultados en diferentes especies, unos casos de esto sería como los de Chang (1968) que reportó el nacimiento del primer mamífero (conejo) generado a partir de dicha técnica y tras el informe de Chang, Whittingham (1968) trabajo con éxito en ratones. En 1971 Crosby y su equipo produjeron crías sanas de ovejas y el mismo año Leman & Dziuk (1971) tuvieron éxito trabajando con cerdos.

A principios de los años 80 finalmente se produjo un becerro proveniente de la fecundación *in vitro*, Brackett y col. (1982) fueron los primeros en publicar el nacimiento de un ternero saludable, en su investigación se utilizaron 22 donantes y 7 receptoras, para la fertilización se utilizó semen fresco, la recogida de ovocitos se realizó por cirugía, se extrajeron 177 ovocitos, de los cuales 52% fertilizaron. A pesar del gran número de embriones producidos solo se logró la preñes en una sola receptora. La primera ternera por fecundación *in vitro* nació pesando 45 kg y después de unos meses de observaciones, no se observaron cambios en el desarrollo y el comportamiento del animal.

En la actualidad, con el avance de las tecnologías, se han realizado varias investigaciones en el área de la fecundación *in vitro* en bovinos, tocando diversos temas como la nutrición de los animales para la calidad del material genético, diferentes métodos de maduración embrionaria, entre otros.

Un ejemplo de lo anteriormente mencionado es la investigación de Cavalieri, Morotti, & Seneda (2018) titulada “Improvement of bovine *in vitro* embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up” o por su traducción “Mejora de la producción embrionaria bovina *in vitro* por sincronización de la onda folicular antes de la recolección del ovulo” en la cual estudian los efectos de la sincronización en la aparición de ondas foliculares ováricas para eficiencia de la producción de embriones *in vitro*. En dicha investigación se utilizaron vacas *Bos indicus* (n = 20), se dividieron en dos grupos (control vs. sincronización) y se sometieron a sesiones repetidas de recogida de óvulos (OPU) (8 réplicas cada una, con un intervalo de 21 días en un diseño cruzado) y posterior producción de embriones *in vitro*.

Las vacas en el grupo de control (n = 10) se sometieron a procedimientos de OPU sin ninguna estimulación cada 21 días. Los animales en el grupo de sincronización recibieron un implante de progesterona basado en protocolo, benzoato de estradiol y prostaglandina en un día aleatorio del ciclo de estro (Día 0) y la OPU se realizó en el Día 5. Para concluir su investigación, los autores llegan a la conclusión de que la sincronización de la onda folicular previa a la OPU mostró efectos positivos en la producción de embriones *in vitro*, así como en las tasas de gestación.

2.2 Marco Contextual

2.2.1 Generalidades de la empresa Vita IVF Lab ubicada en Bogotá, Colombia.

El presente proyecto se llevó a cabo en la empresa Vita IVF Lab ubicada en el barrio Cedritos, calle 144 # 22 – 22 Bogotá, Colombia. Se encuentra a una altitud de 2650 m s. n. m. con una temperatura promedio de 13°C y una humedad relativa del 81%. El objetivo principal de la empresa Vita IVF Lab es la de la producción de embriones bovinos *in vitro* para la venta, realizando procesos desde la recolecta de los ovocitos (OPU), producción del embrión en laboratorio y transferencia del embrión fresco o congelado a la receptora del cliente.

Continuando con la idea anterior, la empresa cuenta con dos pisos, el primero está conformado por el área administrativa en el cual se realizan funciones de coordinación de las diversas gestiones que se generen en los temas de pago, procesos administrativos y administración de salarios; al mismo tiempo esta área esta destinada para la atención de los clientes y para brindarles cualquier información que estos requieran.

Así mismo, el laboratorio en el cual se realizan todos los procesos para la producción de embriones esta separado en 4 secciones, en donde se comienza con el área de termos de nitrógeno e inventario de laboratorio, en dicha área es a donde llega todo el material proveniente del exterior de la empresa como termos de transporte de nitrógeno, termos de nitrógenos de clientes para la llegada de pajillas de semen y para la salida de embriones congelados, transportadoras que se van a campo para la realización de las diferentes OPU para el transporte

de embriones en fresco y material de laboratorio como: placas de Petri de diferentes tamaños (100mm, 60mm y 45mm), tubos eppendorf (1,5ml y 0,5ml), tubos de centrifuga, pipetas, puntas de pipetas de diferentes tamaños (10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L), toallas de papel, entre otras cosas; la segunda área esta conformada por un vestier, en el cual el personal que ingrese al laboratorio debe ponerse implementos como: tapabocas, cofia, polainas o zapatos de laboratorio y bata; la tercera área es un pequeño cuarto que cumple la función de filtro entre la segunda área y la cuarta área; la cuarta área esta conformada por el laboratorio o área de producción, esta a su vez esta dividida en diferente sectores de producción, los cuales son: área de material genético (pajillas de semen y embriones producidos), área de incubadoras, cabina de producción (conformada por el estereoscopio, placas calentadoras, calentador de tubo, etc), área de congelación y espacio de medios.

Del mismo modo, el primer piso cuenta con un patio con tres (3) habitaciones las cuales están destinada para diferentes propósito, la primera se encuentra destinada para el almacenamiento de cilindros de O₂ y nitrógeno que utilizan las incubadoras del laboratorio; la segunda se encuentra destinada para el material de campo como líneas de OPU, guantes, estereoscopio, pipetas, placas, flushing, botas, entre otros; y en la tercera se encuentra una planta de energía que respalda el laboratorio por cualquier falla de luz que pueda ocasionarse.

En cuanto al segundo piso de la empresa, está conformado por un total de cuatro (4) espacios los cuales son: un área de juntas conformada por una mesa con espacio para 6 personas, dos (2) oficinas y un comedor para el personal de la empresa.

2.3 Marco Teórico

2.3.1 Transferencia de embriones

La transferencia de embriones se usa cada vez más en la industria ganadera. Además de las transferencias directas de embriones, muchas biotecnologías basadas en embriones tienen el potencial de mejorar la eficiencia de la producción del ganado a través de estrategias de mejoramiento, al facilitar la introducción de rasgos deseables como la resistencia a enfermedades, una alza en la producción ya sea de carne o leche, mejoramiento en las características fenotípicas, entre otras cosas (Morris, J, & Sreenan, 2002). Sin embargo, estas biotecnologías dependen de un suministro de embriones viables producidos *in vitro* en laboratorio.

Según Palma (2018) la transferencia de embriones bovinos consiste en estimular a una vaca denominada “donadora” mediante un tratamiento hormonal y esta a su vez debe poseer un alto valor genético, que produzca varios embriones en siete días, posteriormente serán recolectados para ser transferidos a vacas conocidas como “receptoras” las cuales se encargan de llevar la gestación hasta el punto del parto; estas deben estar previamente sincronizadas mediante un protocolo de sincronización. Las receptoras no le transmiten ninguna característica genética a la cría, puesto que sirven solo para llevar a cabo la gestación, hasta el parto y finalmente durante la lactancia.

Glenn Selk (2002) en su artículo titulado “Embryo Transfer in Cattle” o traducido al español “Transferencia de embriones en ganado” Explica porque se debe considerar la transferencia de

embriones en ganado bovino como algo positivo, Selk menciona que el potencial reproductivo de cada recién nacido es enorme, la hembra tiene un potencial estimado de 150,000 “huevos” u óvulos y el macho tiene una innumerable cantidad de espermatozoides funcionales; sin embargo por reproducción natural solo una fracción del potencial reproductivo de un individuo destacado podría ser utilizado. El toro promedio logra engendrar entre 15 y 50 terneros por año y la vaca promedio lograra tener un becerro por año. Con la inseminación artificial, es posible explotar la vasta cantidad de esperma producido por un toro genéticamente superior, sin embargo, el potencial reproductivo de la hembra se queda sin utilizar, ella producirá un promedio entre ocho (8) a diez (10) becerros en toda su vida bajo un manejo normal de monta natural o con programas de inseminación artificial; la transferencia de embriones es una técnica que puede aumentar considerablemente el número de crías que una vaca genéticamente importante puede producir.

2.3.2 Selección de donadoras

Citando a Mapletoft & Hasler (2005) la selección de la donadora se basa en dos criterios principales: (1) mérito genético, generalmente determinado por el propietario y basado en el rendimiento y (2) solidez reproductiva, según lo evaluado por el veterinario.

Las donadoras se evalúan mediante un examen de cuello uterino, útero y ovarios por recto para determinar que están libres de adherencias u otras lesiones palpables; también es recomendado verificar la permeabilidad del canal cervical con un dilatador cervical para verificar que la donadora posea un diámetro interno suficiente para permitir el paso de un catéter de recolección (Valladares, 2010).

Suaznabar & Maribel (2018) Indican que la aptitud de una vaca como donadora para la transferencia de embriones se determina por su valor genético y su capacidad para lograr un alto nivel de resultado, entre los puntos que se deben tener en cuenta al momento de seleccionar una donadora tenemos:

- Haber presentado ciclos regulares desde temprana edad.
- No requerir más de dos servicios por concepción.
- No presentar defectos de conformación o genéticos detectables.
- Tener de tres (3) a diez (10) años de edad.
- Debe tener un promedio de días entre calores de 17 y 24 días.
- No deben existir alteraciones en su aparato reproductor. (Quistes, adherencias, infecciones)
- Las vacas deben ser de alto valor genético.
- Deben ser animales libres de parásitos internos y externos.
- Buena condición corporal de 3 – 3,5 en escala del 1 al 5.

Para finalizar, Alberio (2017) nos concluye en su trabajo titulado “manejo de donantes y receptoras” que el manejo de las donantes es uno de los puntos críticos en una transferencia de embriones, si las hembras no están reproductivamente en óptimas condiciones y en un adecuado estado de balance nutricional el programa puede fracasar antes de haber comenzado.

2.3.3 Gestión de las donadoras

Los ovocitos pueden ser recolectados de donadoras ovulantes o superovuladas, Alberio (2017) recomienda que para lograr una eficiencia en el trabajo, deben ser aspiradas mínimo entre 2 a 4 donantes, esto permite compartir el potencial de la donadora a 8 o 10 receptoras en buen estado.

2.3.3.1 Protocolos de sincronización

- a) ***Progesterona o progestágenos.*** Cuando la sincronización de celos en vacas se realiza con progesterona o progestágenos, por lo general se utilizan implantes subcutáneos o dispositivos intravaginales. Cabrera (2020) argumenta en su artículo “Actualización sobre el control del ciclo estral y el desarrollo folicular en bovinos: bases fisiológicas para la inseminación artificial a tiempo fijo” que en los implantes subcutáneos se encuentra el Syncromate B y el Crestar; y los dispositivos intravaginales se incluyen los PRID, CIDR, esponjas, DIB, TRIUB y otras variantes. Todos los dispositivos mencionados anteriormente funcionan de la misma forma, con la excepción de las esponjas vaginales que utilizan un progestágeno como componente hormonal, en el resto esta acción es ejercida por la progesterona natural.
- b) ***Tratamiento de donadoras bovinas con CIDR.*** El CIDR – B esta conformado por un dispositivo encargado de liberar progesterona que puede ser insertado en la vagina de la vaca para estimular la función lútea durante el protocolo para lograr sincronizar el celo, dicho dispositivo debe estar dentro de la vagina del animal durante 7 días y adicional a ello administrar PGF₂ α 24 horas antes del retiro del dispositivo; el dispositivo y a su vez una inyección de prostaglandina dará como consecuencia en la disminución de la progesterona y de esta forma imitar lo que sucede naturalmente durante la luteólisis e iniciarán los mecanismo responsables de la maduración del folículo dominante que está en crecimiento. (Suaznabar & Maribel, 2018)

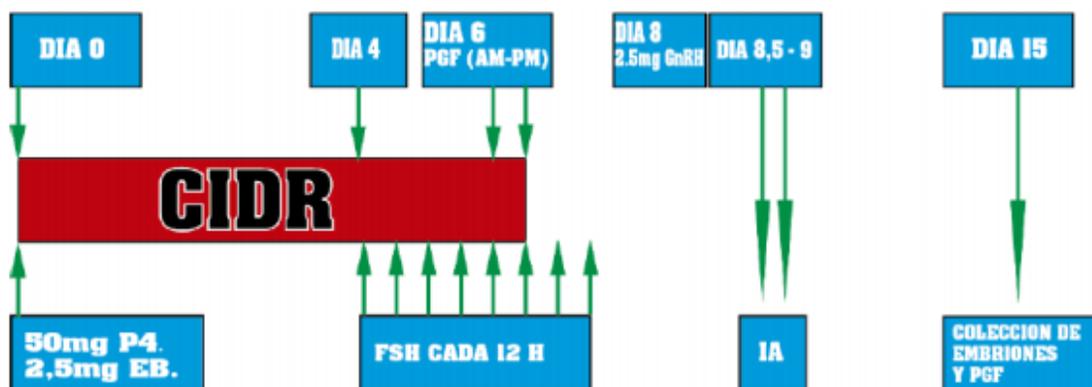


Figura 1 . Protocolo de sincronización y superovulación con CIDR (Suaznabar & Maribel, 2018).



Figura 2. Implementos de protocolo de sincronización (Autor, 2018)

2.3.3.2 Superovulación

La superovulación consiste en la inducción de múltiples ovulaciones en la donadora por la aplicación de hormonas gonadotropinas. Según Miguel Ángel Peña en una publicación realizada por CONtextoganadero titulado “Superovulación, un proceso para obtener más embriones bovinos” nos explica que por lo general, en las vacas solo ovula

un folículo, por lo que con la superovulación se busca que se pueda obtener hasta unos 50 folículos, siendo 12 el promedio a nivel mundial, Peña (2016).

Con base en la investigación de Waltero & Dias (2013) titulada “Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH” nos explica como se realiza una superovulación en vacas, la cual inicia durante la fase lútea media (días 8 a 12 del ciclo de la donadora) luego se deben emplear prostaglandinas (PG) para sincronizar el ciclo de la donadora; alternativamente el tratamiento puede iniciarse el día 16 o 17 (Estro = día 0) del ciclo estral de la donadora; de igual forma se recomienda aplicar inyecciones intramusculares de FSH dos veces al día y prostaglandinas (25 – 35mg de PGF₂α) al momento de la quinta y sexta inyección de FSH en un lapso de 4 días, luego es seguido por el estro en 2 días y la ovulación en 3 días.

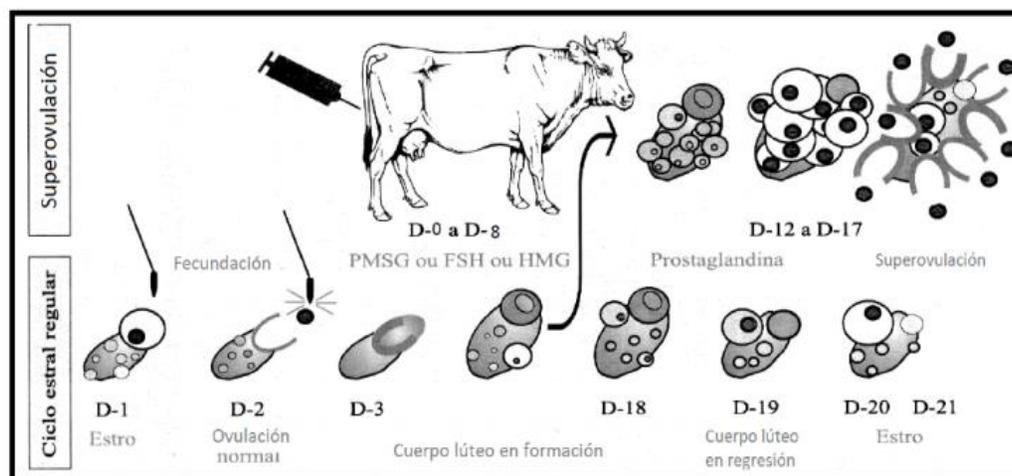


Figura 3. Superovulación vs. Ciclo estral regular (Antonio, 2017)

2.3.3.2.1 Factores que intervienen en la respuesta de la ovulación múltiple.

En un programa de superovulación, por lo general el ejemplar a tratar está involucrado en una gran variedad de procesos, entre los cuales se encuentran de carácter externo (Nutrición y clima) e internos (Hormona, raza y edad)

- a) **Factor Hormona.** Para (Garzon, Urrego, & Giraldo, 2007) las hormonas sueridas por el veterinario para la superovulacion deben ser suministrada en los tiempos indicados. Por ello el profesional que se escoja para el proceso debe estar anteriormente capacitado. La FSH debe ser aplicada con intervalos de 12 horas, ya que el periodo de vida de dicha hormona es de 5 horas. Por todo lo anterior mencionado Garzon, Urrego, y Giraldo, (2007) concluyen en su investigacion que cada laboratorio debe escoger su protocolo de superovulación muy cuidadosamente ya que existen factores externos que afectan positiva o negativamente la respuesta al tratamiento, por lo cual debe tenerse en cuenta este concepto para poder tomar decisiones acertadamente y obtener así óptimos resultados.
- b) **Factor Nutrición.** Castro (2009) resalta que la condicion corporal de una donadora para introducir en protocolos de superovulacion deben ser buena, siendo un 5 a 6 en razas de carne y 2,5 a 3,0 en razas lecheras (figura. 4). Cuando la hembra se encuentra en una condicion de obesidad, estas tienden a almacenar grasa subcutánea alrededor de los ovarios, lo cual da como resultado en la disminucion de la eficiencia en los medicamentos para la superovulacion, dando de igual forma una

disminucion en la cantidad de embriones transferibles; por dicha razon, las hembras que se encuentre en un nivel de obesidad elevado se les debe suministrar una dieta adecuada y reducir la cantida de concentrado suministrado, disminuir los niveles de energia y mantener el nivel de consumo de gramineas y leguminosas (Bielanski & Yadav, 1990).

Según (Becaluba, 2007) en su articulo titulado “factores que afectan la superovulación en bovino” comenta que el estado nutricional de las donadoras tiene mucha influencia sobre la dasa de ovulacion y fecundacion. El estado nutricional de las receptoras es menos exigente que el de las donadoras, ya que estas pueden alimentarse unicamente de forrajes y sus porcentaes de transferencia de embriones pueden ser exitosos, siempre y cuando se les proporcione un buen manejo.

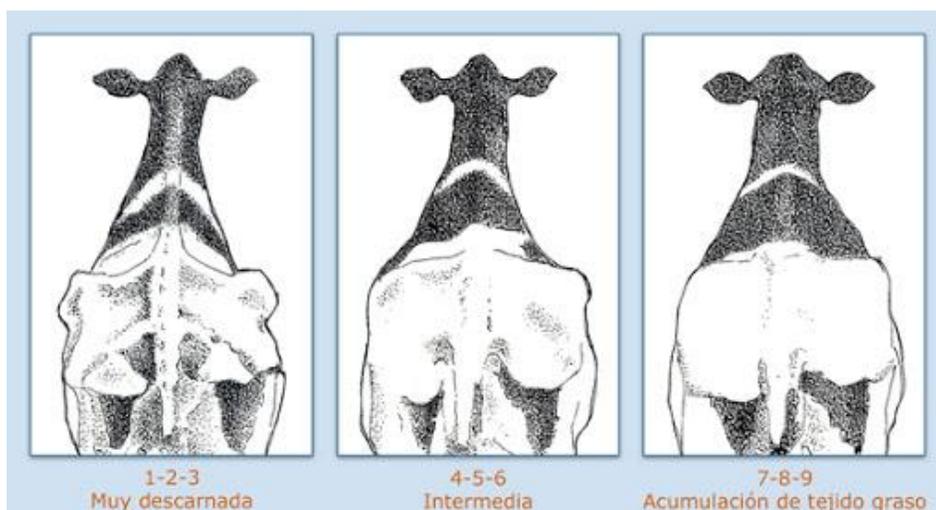


Figura 4. Condición corporal bovina (Ahedo, 2017)

c) **Factor raza.** Cuando se comparan las razas cebubínas (Bos Indicus) y las razas europeas (Bos Taurus) al momento de un proceso de superovulación, se puede notar que las cebubínas necesitan menos cantidad de hormonas (como la FSH) que las razas europeas; sin embargo las razas europeas demuestran una mejor respuesta en la obtención de embriones después del tratamiento de superovulación a comparación de las cebubínas (Silva, Alvarez, Zanenga, & Pereira, 2009). Por otro lado Jiménez (2009) afirma que existe información en la literatura acerca de algunas razas que no producen embriones tan resistentes a comparación de los de otras razas, entre ellas se encuentran los embriones congelados y descongelados de la raza Jersey, los cuales presentan menores porcentajes de preñez que las demás razas.

Otro aspecto importante a resaltar es el que observan Quispe, Ancco, & Solano (2018) en su investigación titulada “Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero” en el cual exponen la diferencia entre la producción de ovocitos en razas Bos Taurus y Bos indicus, explicando que las razas Bos indicus al ser aspiradas para realizar una fertilización *in vitro* (FIV) producen mayor cantidad de ovocitos viables a comparación de las razas Bos Taurus.

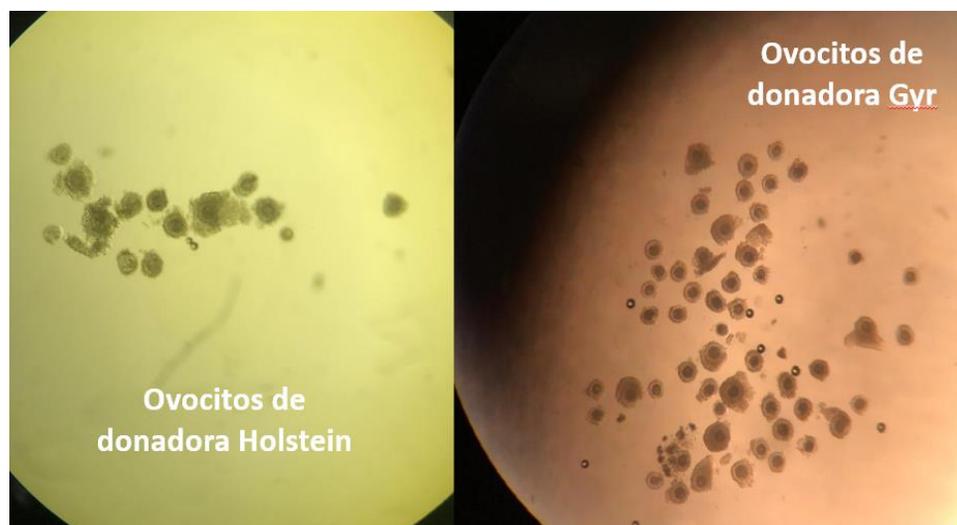


Figura 5. Comparación de ovocitos raza indicus y taurina (Autor, 2020)

d) **Factor edad.** Según Jiménez (2009) La edad de la donadora es un factor importante sobre la respuesta en la producción de embriones, ya que las vacas cuando se encuentran en un estado de adultez, logran producir una mayor cantidad de embriones viables y transferibles a comparación de novillas, sin embargo cuando se trata el caso de las receptoras frente al programa de transferencia de embriones, se logra apreciar que al utilizar novillas como receptoras se pueden obtener mayores tasas de preñez, en comparación a las vacas adultas.

Garzón, Urrego y Giraldo (2017) expone en su artículo titulado “Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos” las investigaciones de varias personas comenzando con el de Taneja y col (2000) en donde se utilizaron dos protocolos diferentes en los cuales se escogieron terneras y vacas adultas, estas se estimularon con Folltropin V, progestil, norgestomet, synchomate-B y CIDR-G. Al finalizar la investigación se

concluyó que las terneras estimuladas con CIDR-G produjeron un mayor número de embriones transferibles.

- e) **Factor clima.** El factor clima, a pesar de ser uno de los mas olvidados de todos, es muy importante en el proceso de superovulación; una donadora que no se encuentre en óptimas condiciones climáticas tendera a presentar complicaciones, lo cual dará como resultado en una mala producción de embriones teniendo en cuenta que la donadora gastara una gran cantidad de energía para adaptarse al medio ambiente y no tendrá energía restante para realizar adecuadamente sus funciones reproductivas. Además, el metabolismo de la donadora se descontrolara causando a su vez un estrés y afectando negativamente a la producción de ovocitos (Suaznabar & Maribel, 2018).

2.3.4 Recolección de ovocitos (OPU)

La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía o también conocida como OPU (Ovum Pick-Up) es una técnica que le ofrece al productor extraer ovocitos de donadoras que se encuentren en diferentes estados fisiológicos como cíclicas, durante el primer tercio de la gestación, las que no responden a estímulos hormonales, terneras y novillas prepúberes a partir del 6°-8° mes de edad (López, 2010).

- 2.3.4.1 Aspiración transvaginal guiada por ultrasonido.** Para lograr realizar una OPU correctamente, es indispensable tres (3) factores indispensables: un equipo de

ultrasonido (ecógrafo) con su respectivo transductor, una bomba de aspiración y un sistema de guía de aguja conectado a un tubo conector (Ramos, 2011)

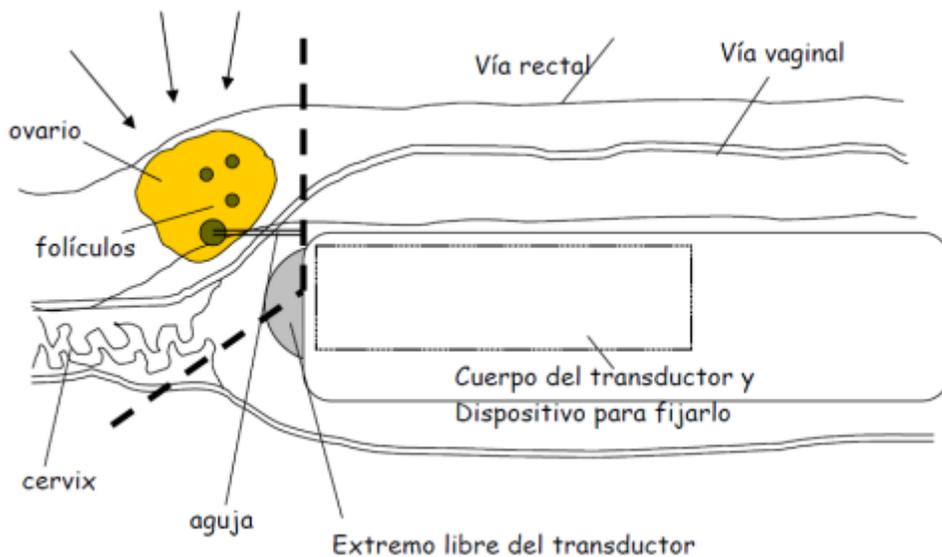


Figura 6. Partes y posición del transductor dentro de la vaca (Sedena, 2005)

Según Nava, Hernandez y Hugo (2005) el proceso de aspiración folicular comienza con la aplicación de una anestesia epidural (5ml de lidocaina al 2%) lo cual genera la insensibilización del aparato genital y una disminución de los movimientos peristálticos a nivel del recto, facilitando de este modo la localización y manipulación de los ovarios; luego se procede a extraer las heces fecales del recto de la donadora para proceder con la limpieza, desinfección, y secado de la vulva.

Cuando ya el área de la vulva se encuentre completamente limpia, se procede a introducir el transductor en la vagina de la donadora (previamente a ello, se coloca la aguja para OPU en la guía del transductor), la cabeza del

transductor debe en cualquiera de los dos lados del cérvix dependiendo del ovario en el que se realizara la punción; luego se procede a introducir la mano izquierda por el recto de la donadora y se fija el ovario contra la cabeza del transductor, lo que permite observarlo en la pantalla del equipo de ultrasonografía junto a sus folículos, del mismo modo, en la pantalla se logra apreciar la trayectoria de la aguja lo que permite ubicar los folículos para extraerlos exitosamente. Cuando se logre localizar el folículo a aspirar, el aspirador procederá a impulsar la aguja suavemente logrando penetrar la pared vaginal y luego la folicular; una vez logrado penetrar las paredes, la bomba de vacío aspira el contenido depositándolo en el recipiente destinado para los ovocitos (Ramos, 2011).

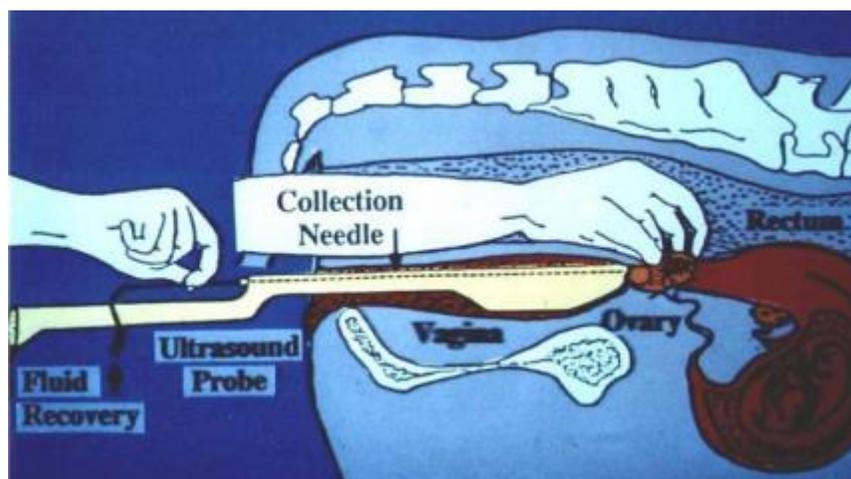


Figura 7. Colocación del transductor y el ovario para aspiración folicular (Nava, Hernandez, & Hugo, 2005)

Al observar los folículos en la pantalla, se logra observar imágenes anecogénicas (color negro) en el ovario.



Figura 8. Folículos vistos a través del equipo de ultrasonido (Autor, 2020)

2.3.4.2 Búsqueda de ovocitos. La identificación y evaluación de ovocitos después de la aspiración folicular es uno de los aspectos más importantes que enfrenta el ovocito, por ello para esta práctica se debe buscar un profesional calificado en el área; las malas técnicas de manejo en este proceso pueden afectar directamente las tasas de embarazo. Para la búsqueda de ovocitos se necesitan una gran variedad de implementos entre los cuales están: un (1) estereoscopio, dos (2) placas calentadoras a 38°C (una para el estereoscopio y otra para la mesa), un (1) calentador de tubos, pipetas de 1000 μ L y 10 μ L, puntas de 1000 μ L y 10 μ L, filtro, jeringas, Capsulas de Petri de 65mm y una transportadora de ovocitos.

Según Gibbons & Cueto (2013) expresa en su manual titulado “Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos” que el medio recolectado en la aspiración folicular debe ser vertido sobre un filtro para lograr eliminar todos los rastros de sangre e impurezas posibles, posterior a ello el restante en el filtro en

donde se encuentran los ovocitos se transpasa a una placa de petri para facilitar la búsqueda, dicha búsqueda se realiza en un esteroscopio sobre una placa termica con una temperatura fija entre 37°C y 38°C; A medida que se van identificando los ovocitos en la capsula de petri, estos son aspirados a traves de micropipeta y transpasados a una caja de petri diferente con un medio de conservacion enriquecido con suero al 20%, del mismo modo se debe asegurar que el area de busqueda no le pegue directamente la luz del sol y estar a una temperatura ideal de laboratorio. Una vez finalizada la busqueda de los ovocitos, se realiza la clasificacion de los mismos.



Figura 9. Implementos para la búsqueda de ovocitos (Autor, 2020)

2.3.4.2.1 Medio ambiente. Youngquist y Threlfall (2007) en su libro titulado “Large Animal Theriogenology” o en español “Teriogenología de animales grandes” manifiesta que una vez aspirado el ovocito, este debe mantenerse en unas condiciones de temperatura, osmolaridad y pH similares a la de la donadora

ya que una variación drástica en estos factores puede afectar la viabilidad del futuro embrión; para almacenar los ovocitos se recomienda hacer uso de una incubadora portátil con temperatura controlada para el transporte a larga distancia y su duración debe estar entre 12 a 24 horas máximo y que no supere temperaturas de 39°C; el rango de pH adecuado para los ovocitos es de 7,1 y 7,5 por lo tanto el pH del lavado y la retención los medios deben estar dentro de este rango; en cuanto a la osmolaridad normal del líquido es de 270 a 300 miliosmoles. La exposición de los ovocitos a rayos ultravioletas por un periodo alargado de tiempo puede causar muerte celular y de este modo haciendo inutilizables los ovocitos recolectados.

2.3.4.2.2 *Identificación de los ovocitos.* Para realizar una identificación de ovocitos Contreras y Corona (2010) aclara que es indispensable el uso de un estereoscopio ya que solo con el se lograra observar las características a evaluar de los ovocitos. El ovocito presenta una forma esférica y está compuesta de células (blastómeros), esta a su vez se encuentra rodeada por una capa conocida como zona pelúcida, la cual presenta un diámetro de 150 a 180µm incluyendo un espesor de zona pelúcida de 12 a 15µm, adicional a ello el ovocito presenta una capa de forma irregular conocida como “células del *cumulus*” y su espesor no suele tener un valor específico (Youngquist & Threlfall, 2007)

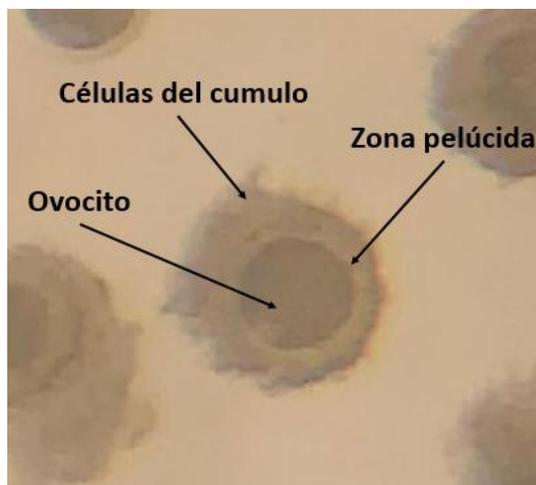


Figura 10. Partes de un ovocito (Autor, 2020)

2.3.4.2.3 Clasificación de los ovocitos. Gardón (2000) propone un esquema de clasificación de acuerdo a la apariencia que presenten las células del *cumulus*, ya que teniendo en cuenta este aspecto, los ovocitos pueden dividirse en cinco categorías:

a) Ovocito G1. Ovocitos con más de tres capas de células de *cumulus* compactas y con citoplasma homogéneo uniformemente granulado.

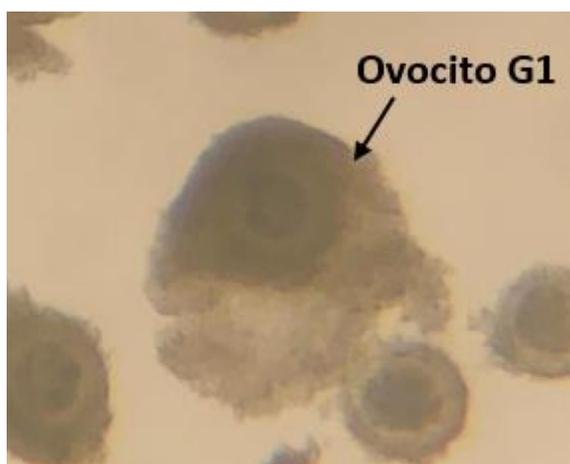


Figura 11. Ovocito G1 (Autor, 2020)

- b) **Ovocito G2.** Ovocitos con menos de tres capas de células del *cumulus* y citoplasma generalmente homogéneo.



Figura 12. Ovocito G2 (Autor, 2020)

- c) **Ovocito G3.** Ovocitos con una sola capa de células del cúmulo y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras.



Figura 13. Ovocito G3 (Autor, 2020)

d) *Ovocito desnudo*. Ovocitos que no presentan células del cúmulo.



Figura 14. Ovocito Desnudo (Autor, 2020)

e) *Ovocito con citoplasma irregular*. Ovocitos que presentan diferentes tonos de pigmentación en el citoplasma.



Figura 15. Ovocito con citoplasma irregular (Autor, 2020)

2.3.5 Desarrollo embrionario

Palma (2010) expresa que el desarrollo embrionario comienza desde el día del estro y este a su vez es denominado como el “día 0”, después de ello, el día uno (1) corresponde a la ovulación y de esta forma 3 días después de la fertilización del cigoto, este empezará a dividirse en varias células, estas primeras divisiones serán conocidas como clivaje (del inglés: cleavage) o segmentación; cada una de las nuevas células formadas serán conocidas como blastómeros y a medida que pase el tiempo el embrión realizará un segundo clivaje para formar 4 blastómeros y así sucesivamente hasta lograr una estructura de más de 16 blastómeros llamada mórula.

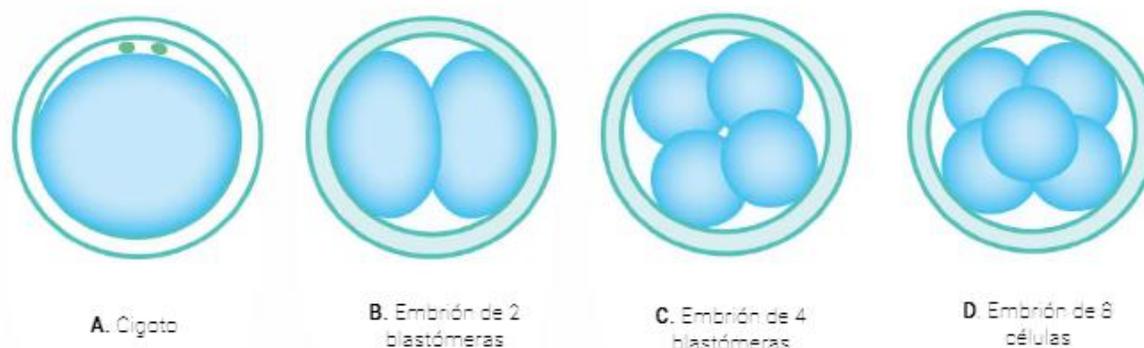


Figura 16. Clivaje de un embrión (Carillo, Lenis, & Rodriguez, 2014)

Carillo, Lenis y Rodriguez (2014) nos explican que la mórula continúa su clivaje hasta alcanzar un número alrededor de 64 blastómeros; luego se comienza a formar un espacio llamado blastocele el cual se crea por la ganancia de iones y agua por parte del embrión, dicho proceso recibe el nombre de cavitación el cual da como resultado una estructura embrionaria llamada blastocisto en la cual se diferencian dos tipos de células: las células que se encuentran ubicadas al borde interno de la zona pelúcida, lo cual se terminan denominando como “células trofoblásticas” que conforman el trofoblasto y las células que tienden a agruparse en uno de los lados del embrión y se conocen como “embrioblasto”.

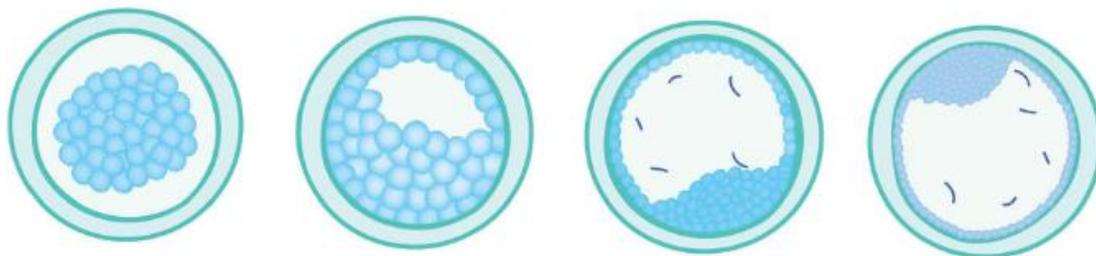


Figura 17. desarrollo embrionario a partir de una mórula hasta llegar a un blastocisto expandido (Carillo, Lenis, & Rodriguez, 2014)

Continuando con el trabajo de Carillo, Lenis y Rodriguez (2014) explican que una vez se encuentra el blastocisto expandido, este continua su desarrollo y del mismo modo va aumentando su tamaño lo cual da como resultado que el fluido del blastocele ejerza presión en la zona pelúcida y finalmente esta se rompa y eclosione el blastocito.

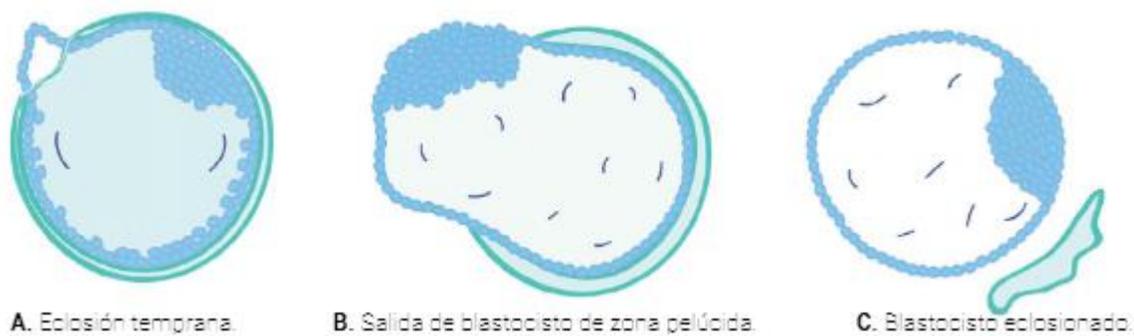


Figura 18. Formación del blastocisto eclosionado (Carillo, Lenis, & Rodriguez, 2014)

2.3.5.1 Calidad embrionaria

Según Palma (2010) se consideran los siguientes criterios sobre las estructuras y cualidades de un embrión de excelente calidad.

- Forma esferoide del embrión.
- Homogeneidad de los blastómeros.
- Tonalidad uniforme de los embriones.
- Homogeneidad de la membrana celular.
- Zona pelúcida intacta.
- Carencia de detritus celulares y mucosidades adosadas a la zona pelúcida.
- Compactación o agrupación de los blastómeros entre sí.

2.3.5.2 Clasificación de los embriones

Los embriones recuperados de 5 a 8 días después del estro se clasifican morfológicamente en los siguientes grupos, basados en su etapa de desarrollo. (Youngquist & Threlfall, 2007)

- a) **Mórula (Mo)**. los blastómeros son de forma redonda y no son estrechamente conectados entre sí; su forma se asemeja a la de una mora.

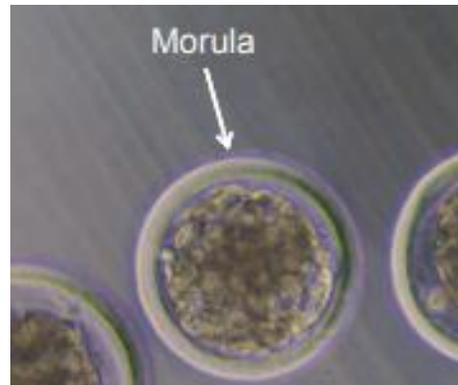


Figura 19. Mórula (Hansen, 2013)

- b) *Mórula compactada (Mc)*. Presenta una forma de una mórula apretada, es similar a una pelota de golf, en el sentido de que el borde exterior es ligeramente ondulado (festoneado) en apariencia debido a compactación los blastómeros individuales, ya los blastómeros no son distinguibles.



Figura 20. Mórula compactada (Hansen, 2013)

- c) *Blastocito temprano (Bt)*. un pequeño espacio transparente que contiene líquido es visible. Esta área es el comienzo de la blastocela, el embrión ocupa del 70% al 80% del espacio perivitelino.

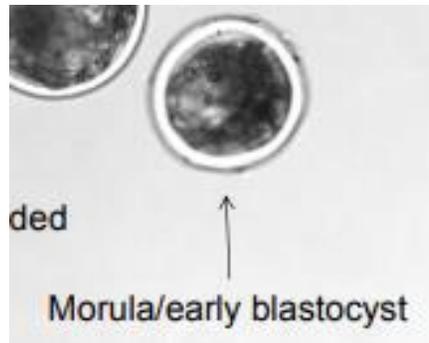


Figura 21. Blastocito temprano (Hansen, 2013)

- d) *Blastocisto (Bx)*.** Se diferencia fácilmente las células del trofoblasto, que se adhiere a la zona pelúcida y el macizo celular interno se nota más oscuro; el blastocele ocupa el 70% del embrión.

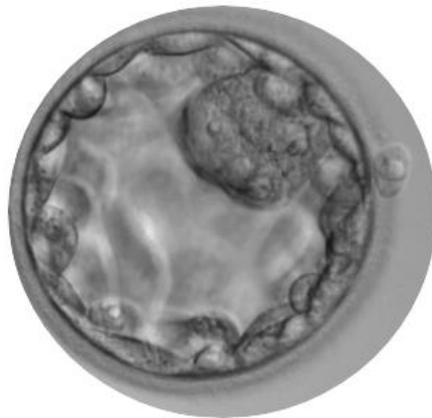


Figura 22. Blastocisto (Tambre, 2017)

- e) *Blastocisto expandido (Be)*.** La zona pelúcida se adelgaza a medida que se expande el blastocisto, al mismo tiempo se puede apreciar una pequeña concentración de células internas; el color del embrión es pálido debido a la gran cantidad de líquido presente en el interior.

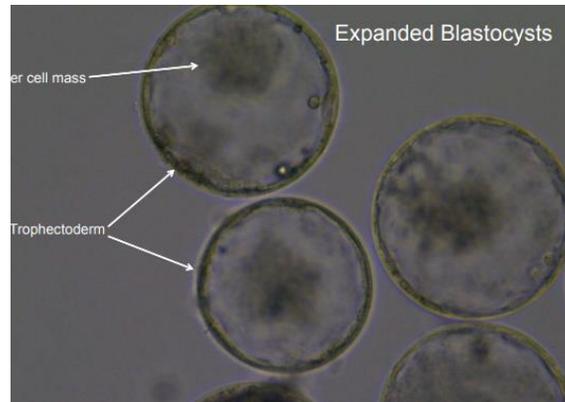


Figura 23. Blastocisto expandido (Hansen, 2013)

- f) *Blastocisto eclacionado (Bp)*. Finalmente, el blastocisto se expande hasta el punto de ruptura y el embrión escapa de la zona.

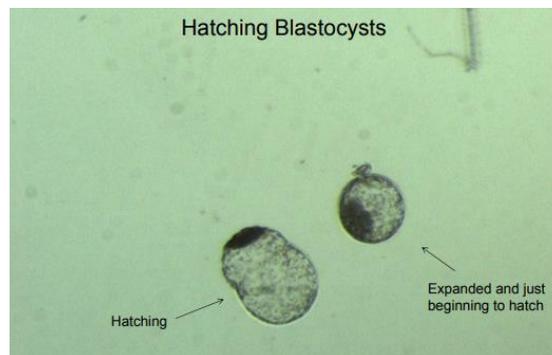


Figura 24. Blastocisto eclacionado (Hansen, 2013)

2.3.5.3 Códigos para la calidad del embrión

- a) *Código 1 - Excelente o bueno*. El embrión debe presentar una estructura simétrica, una masa embrionaria esférica con blastómeros uniformes en tamaño, color y densidad; la zona pelúcida debe ser lisa y no tener

superficies cóncavas o planas que puedan causar que el embrión se adhiera a una placa de Petri o a la pajilla (Mapletoft, 2013)

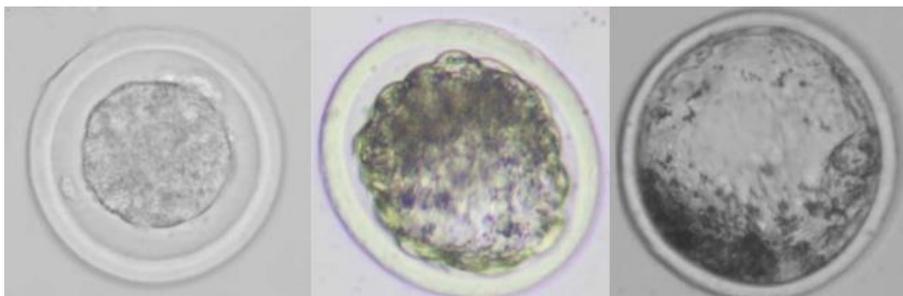


Figura 25. Embriones código 1 – excelente o bueno (Larson, 2016)

- b) **Código 2 – Justo.** Un embrión código 2 presenta irregularidades moderadas en la forma general, en su masa o tamaño; por lo menos el 50% del material celular debe estar intacto (Larson, 2016).

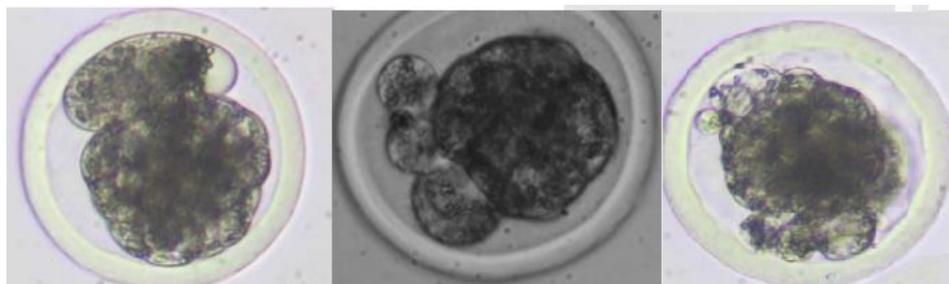


Figura 26. Embriones código 2 – justo (Larson, 2016).

- c) **Código 3 – pobre.** Un embrión código 3 contiene una gran cantidad de irregularidades en la forma del embrión, el tamaño, color y densidad; Al menos un 25% del material celular debe estar intacto (Larson, 2016).

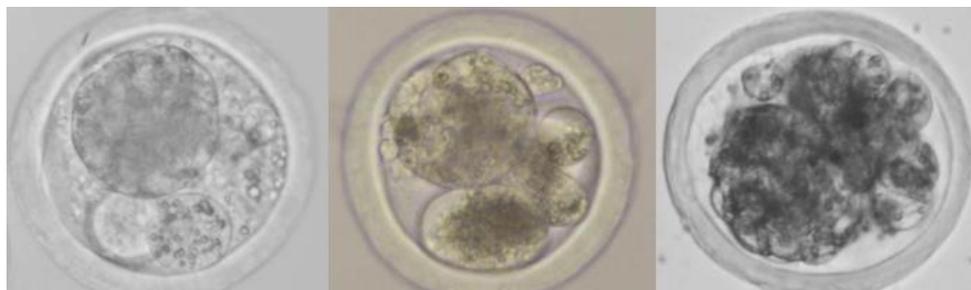


Figura 27. Embriones código 3 – pobre (Larson, 2016).

- d) Código 4 - Muerto o degenerado.** Un embrión de código 4 incluye a los embriones degenerados y ovocitos sin fertilizar; por lo tanto no son viables (Mapletoft, 2013)

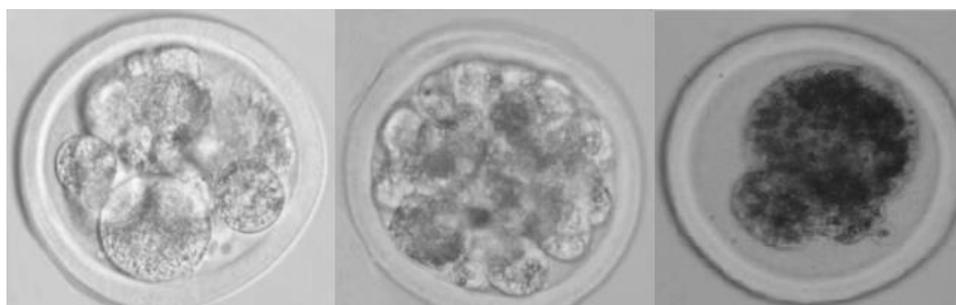


Figura 28. Embriones código 4 – muerto o degenerado (Larson, 2016).

2.3.6 Selección de receptoras

A diferencia de las donadoras, las receptoras no se escogen teniendo en cuenta su valor genético, ya que este valor no será transferido a la cría (Baril & Brebion, 1995). La Hacienda el Cucharó (2020) en su publicación titulada “Consideraciones para el momento de seleccionar un vientre receptor para la FIV” en su página oficial, explica una variedad de aspectos a tener en cuenta al momento de seleccionar a una receptora, entre los cuales están:

- a) **Fenotipo.** Las receptoras a escoger deben poseer una buena amplitud entre isquiones e iliones lo cual sera uno de los puntos fundamentales al momento del parto y una buena amplitud en la linea ventral.

- b) **Palpación.** Se debe realizar una palpacion para asegurarse que la receptora no este preñada, se encuentre ciclando de manera normal y que su aparato reproductivo se encuentre en optimas condiciones.

- c) **Sangrar los vientres.** Esto se realiza con el fin de realizar pruebas para verificar que la donadora se encuentre libre de enfermedades como brucelosis, tuberculosis e IBR; descartando de este modo futuros abortos.

2.3.7 Procedimiento de transferencia de embriones a receptora

Según Troxel (s.f) Los embriones bovinos se transfieren directamente a través del cuello uterino del mismo modo que una inseminación artificial; en el laboratorio el embrión es introducido en una pajilla de 0,25ml, dicha pajilla despues de ser descongelada se toma cuidadosamente por el extremo donde se encuentra el sello de algodón y se inserta en la pistola de T.E; luego se introduce la pistola que contiene la pajueta con el embrión dentro de la funda para la T.E y finalmente para finalizar la preparación de la pistola, se coloca una camisa protectora estéril plástica que lo protege con cualquier suciedad y luego se introduce la pistola por la vagina de la vaca (Banegas & Peralta, 2007).

Según (Moreno, 2004) la preparación de la receptora en la manga se inicia con una inyección de anestesia epidural la cual se encarga de bloquear los movimientos peristálticos del recto de la vaca; luego se aplica de 5 a 10 mL de Lidocaína al 2% entre las articulaciones del sacro y la primera vértebra coccígea. Para finalizar, cuando ya estén todos los implementos listos, se procede a transferir el embrión de la misma forma que se realiza una IATF.



Figura 29. Introduciendo pajilla de embrión congelado en pistola de T.E. (Autor, 2020)

2.3.7.1 Protocolo de descongelación para embriones congelados en glicerol

Según Mapletoft (2013) el protocolo ideal para descongelar una pajilla de embrión inicia con seleccionar la pajilla, retirarla del termo de nitrógeno líquido, mantenerlo en el aire durante 15 segundos y posterior a ello introducirlo 15 segundos más en agua tibia a 37°C; después de estos simples pasos, la pajilla ya se encontrará lista para introducirla en la pistola de T.E y transferirlos a la receptora.



Figura 30. Descongelando pajilla de embrión congelado (Autor, 2020)

2.4 Marco Legal

2.4.1 RESOLUCION ICA 20033 de 2016

En la presente resolución se establecen los requisitos sanitarios y de bioseguridad para el registro de centrales de recolección y procesamiento, unidades de procesamiento, unidades de recolección e importadores de material genético de especies de interés zootécnico (Instituto Colombiano Agropecuario, 2016)

2.4.1.1 Anexo 1. En el presente anexo se explica en detalle un manual de buenas practicas de bioseguridad (BPB) para las centrales de recolección y procesamiento de material genético de especies de interés zootécnico, en el cual se mencionan puntos a seguir fuera del área de laboratorio como: requisitos generales de bioseguridad, requisito en las áreas de trabajo, requisitos en el personal, controles sanitarios, rotulado y transporte del material seminal y/o embriones y los procedimientos operativos estandarizados (POE).

2.4.1.2 Anexo 2. En el presente anexo se explica en detalle un manual de buenas practicas de bioseguridad (BPB) para las unidades de procesamiento de material genético de especies de interés zootécnico, en el cual se mencionan puntos a seguir por el personal de laboratorio como: requisitos generales de bioseguridad, requisito en las áreas de trabajo, requisitos en el personal, controles sanitarios, rotulado y procedimientos operativos estandarizados (POE).

Capítulo 3. Diseño Metodológico

3.1 Tipo de investigación

La presente investigación es de carácter descriptivo, en el cual se expresan las características de un grupo o situación, midiendo o evaluando diversos aspectos, variables y dimensiones del objeto de estudio; en otras palabras, el objetivo de la investigación se centra en la descripción de un determinado proceso.

Este trabajo de pasantía tuvo como objetivo el identificar, categorizar y evaluar los parámetros técnicos empleados para la producción de embriones *in vitro* enfocados en la especie bovina para realizar un adecuado diagnóstico de la empresa Vita IVF Lab.

3.2 Población y muestra

a) Población

La empresa Vita IVF Lab maneja un promedio de 557 embriones bovinos mensuales en el año 2020.

b) Muestra

Se observaron un total de 1671 embriones producidos en un periodo desde el 12 de Febrero hasta el 18 de Mayo del año 2020.

3.3 Actividades desarrolladas

a) Actividades a nivel de laboratorio

En términos generales las actividades desarrolladas a nivel de laboratorio durante el transcurso de la pasantía fueron: recepción y almacenamiento de semen congelado, preparación de medios de maduración para campo, descongelación de pajillas para FIV, marcación de placas de Petri para la FIV, CIV y D4, rotulación de embriones congelados y gobelets (con etiquetas producidas con la etiquetadora BRADY con datos como nombre de donadora, nombre de toro, proceso, fecha de congelación, entre otros), congelación de embriones (colocarles el lacrador, introducir las pajillas a la congeladora y realizar el seeding), preparación de semen para la FIV, almacenamiento de embriones congelados en termos de nitrógeno, almacenamiento de embriones para trabajo en fresco en la transportadora, preparación de embriones para entrega, entrega de embriones congelados a clientes, recepción y almacenamiento de embriones devueltos al laboratorio por no ser

transferidos en campo, tomar T° de las transportadoras cuando llega con ovocitos de campo, chequeo de los niveles de nitrógeno de los termos, rellenar termos de nitrógeno, desinfección de las instalaciones del laboratorio y materiales.

b) Actividades a nivel de campo

En términos generales las actividades desarrolladas a nivel de campo durante el transcurso de la pasantía fueron: desinfección del área de búsqueda de ovocitos, adecuación del área de búsqueda de ovocitos (armar estereoscopio, conectar placas calentadoras y calentador de tubos, entre otras cosas), desinfección de materiales de búsqueda, recepción de tubo con ovocitos proveniente de la aspiración folicular, filtrar la muestra obtenida de la aspiración folicular para la obtención de ovocitos, traspasar los ovocitos del filtro a la placa de Petri para realizar la búsqueda.

c) Actividades a nivel de oficina

Ingresar datos al software de la empresa Vita IVF Lab proporcionado por Vytelle (myembryos) como entrada y salida de pajillas de semen, entrada y salida de embriones frescos y congelados, descarte de pajillas por venta o mal estado, generación de informes (stock de embriones congelados, aspiración de ovocitos, previsión de embriones y producción de embriones); del mismo modo, ingresar datos a la app proporcionada por Vytelle (Vytelle – IVF) como datos de las OPU realizadas en campo (Cantidad y calidad de ovocitos), cruces de las donadoras y toros, preparación del semen (cantidad de pajillas usada en la FIV, volumen, hora, responsable, entre otros), datos del clivaje y previsión por

donadora, datos de congelación de embriones (responsable, método de congelamiento, responsable, canastilla y termo de almacenamiento) y salida de embriones congelados (responsable, fecha y cantidad de embriones).

Adicional a todas las actividades anteriormente mencionadas, también se realizaron actividades como realización de inventarios semanales, entre los cuales estaban: materiales de laboratorio (Placas de Petri, puntas, gobelets, pajillas de embriones, criotubos, entre otros), materiales de campo (Flushing, placas de Petri, criotubos de 50ml, líneas OPU, guantes, entre otros), medios de laboratorio (Medio de maduración, aceite, freezing, entre otros) y de pajillas de semen; realización de formatos de salida de embriones y salidas de transferencia directa para clientes; modificación del inventario de toros en el software myembryos adicionando datos como: Registro, ID habitual, raza y nombre completo (datos sacados de Asocebu); apoyo para obtener certificación por parte del ICA de las BPB para las centrales de recolección y procesamiento de material genético (realización de POES, adecuación de formatos, adecuación de áreas, etc).

Capítulo 4. Administración del proyecto

4.1 Recursos humanos

Para el desarrollo de este proyecto se tuvo como principal investigador la estudiante de zootecnia Kerly Roxana Velazco Pinto, quien contó con la tutoría del docente César Augusto Portilla Luna, y coordinadora encargada de la supervisión y tutoría en la empresa, María Fernanda Morales Calvo.

4.2 Recursos institucionales

El presente trabajo contó como recurso institucional la empresa Vita IVF Lab ubicada en Bogotá en el barrio Cedritos.

Capítulo 5. Resultados y discusión

A continuación se presentan los resultados finales de cada uno de los objetivos propuestos en el desarrollo de la pasantía.

5.1 Objetivo 1

Realizar un análisis de las técnicas y áreas utilizadas para la producción de embriones bovinos *in vitro*.

5.1.1 Meta

Identificar las instalaciones de la empresa Vita IVF Lab para poder reconocer las diferentes áreas de trabajo, personal asignado y tareas básicas a realizar.

5.1.2 Actividades

- Recorrido de las instalaciones, por el laboratorio de producción, áreas de oficina y atención a clientes, áreas de filtros de seguridad, área de almacén de cilindros, área de planta de energía, área de almacenamiento de termos de nitrógeno, área de almacenamiento de material de laboratorio y área de almacenamiento de material de campo.
- Reconocimiento del personal que labora en la empresa, tanto el personal de laboratorio, de campo y oficina.

- Inducción sobre temas y actividades básicas para la producción de embriones bovinos *in vitro*.
- Asesoramiento sobre ingreso de información en registros.

5.1.3 Resultados

En la semana del diecisiete (17) al veintiuno (21) de febrero (primera semana de pasantía), se realizó un reconocimiento general de las instalaciones, del personal que labora en la empresa y a su vez la inducción general de los procedimientos llevados a cabo en una producción de embriones *in vitro*.

a) Área principal de oficina

Es la primera área que se observa cuando se entran a las instalaciones, esta se encuentra señalizada con su respectivo letrero, en dicha área se realizan funciones como los papeleos referente a las cuentas, pagos a trabajadores, compra de materiales e insumos de laboratorio, recepción y atención de clientes, entre otras funciones; El área cuenta con dos escritorios, sillas, materiales de oficina, estantes de carpetas, computadora e impresora.



Figura 31. Oficina principal (Autor, 2020)

b) Área de material de campo

Esta área se encuentra fuera de las instalaciones principales (en el patio) ya que al ser material que viene del exterior, suele entrar y salir de varios predios, por ello es preferible alejarla de las áreas del laboratorio para evitar contaminaciones; esta área está constituida por un cuarto de 6 x 5 metros y un baño en donde se almacenan los implementos de limpieza; el cuarto tiene dos estantes en los que se almacenan materiales como: transportadoras, capsulas de Petri, puntas de 1000 μL y 10 μL , líneas OPU, aguja de OPU, camisa para guía de OPU, papel kraft, gel de ultrasonido, guantes de latex talla S y M, guantes de palpación y medicinas como heparina y lidocaína; en esta área también se almacenan implementos como botas de caucho, cajas que contienen el equipo de ultrasonido (ecógrafo), transductor, la bomba de aspiración, estereoscopio, pipetas, placas calentadoras, calentador de tubos, entre otros implementos.



Figura 32. Estantes del área de material de campo (Autor, 2020)



Figura 33. Material que sale a campo (Autor, 2020)

c) Área de cilindros

Esta área, al igual que la anterior, se encuentra fuera de las instalaciones principales (en el patio) y está constituido por una pequeña caseta de 1 x 2 metros alejada de cualquier fuente eléctrica, en el interior contiene 4 cilindros (dos de Co^2 y dos de nitrógeno) que son

proporcionados por la empresa Cogas Ltda. la cual está especializada en la fabricación, distribución, y comercialización de gases industriales, gases medicinales, gases especiales, oxígeno, soldaduras y equipos (Cogas, 2019), dichos cilindros se encuentran conectados a través de tuberías con las incubadoras que se encuentran al interior del laboratorio.



Figura 34. Caseta de cilindros (Autor, 2020)



Figura 35. Patio trasero (Autor, 2020)

d) Área de planta de energía

Esta área, al igual que las anteriores, se encuentra fuera de las instalaciones principales (en el patio) y está constituida por una habitación de 3 x 4 metros, en ella se encuentra una planta eléctrica la cual arranca automáticamente ante cualquier falla de luz y mantiene con energía las instalaciones del laboratorio que necesitan flujo constante de energía (incubadoras, nevera donde se guardan los medios, campana de laboratorio, entre otras.)



Figura 36. Planta de energía de la empresa Vita IVF Lab (Autor, 2020)

e) Área de recepción de pajillas de semen, almacenamiento de termos de nitrógeno y almacén de inventario

Esta área se encuentra dentro de las instalaciones principales y es la más cercana al área del laboratorio, está conformada por un cuarto de 5 x 3 metros con 3 puertas: la primera que conecta con el corredor principal (puerta corrediza), la segunda que es la entrada al primer filtro de seguridad hacia el laboratorio y la tercera que es una pequeña puerta de un metro de altura que conecta el área de recepción de pajillas de semen, almacenamiento de termo y

almacén de inventario con el laboratorio; la presente área sirve para almacenar los termos de nitrógeno pertenecientes a la empresa (5 termos de 50 litros y 1 termos de 10 litros) y termos de nitrógeno de clientes; almacenar el inventario destinado para el laboratorio en un estante de plástico blanco (placas de Petri, puntas de diferentes tamaños, criotubos, alcohol, Oosafe, entre otros) y para realizar la recepción de pajillas de semen sobre una mesa con toda la implementaría necesaria para su almacenamiento (cava de icopor, pinzas metálicas, envase para traspasar nitrógeno líquido del termo a la cava, gafas protectoras, escalerillas, gobelets, tabs, lapicero y marcadores).



Figura 37. Área de recepción de pajillas de semen, almacenamiento de termos de nitrógeno y almacén de inventario (Autor, 2020)



Figura 38. Mesa e implementos para la recepción de pajillas de semen (Autor, 2020)

f) Área de filtros de seguridad

La presente área, a pesar de ser pequeña es muy importante para la prevención de contaminación en el laboratorio, consta de dos habitaciones de 1,5 x 1,5 metros, la primera habitación tiene acceso a través del área de recepción de pajillas de semen, almacenamiento de termos de nitrógeno y almacén de inventario; consta con un gavetero plástico de tres compartimientos en el cual se almacena los implementos de vestimenta necesarios para el ingreso al laboratorio, entre ellos están: cofia, guantes de látex, tapabocas desechables, bata y polainas desechables; el segundo cuarto es una pequeña área de 1 x 1 metros, esta área tiene acceso desde el primer filtro de seguridad, en su interior no tiene nada y lo único que se logra observar es otra puerta por la cual se ingresa al área del laboratorio.



Figura 39. Primer filtro de seguridad (Autor, 2020)



Figura 40. Implementos de vestimenta para ingresar al laboratorio (Autor, 2020)

g) Área de laboratorio

En la presente área se centra la mayor parte de la pasantía, está conformada de una habitación de 5 metros x 8 metros de profundidad, esta área cuenta con toda la instrumentaría necesaria para la producción de embriones bovinos *in vitro* (incubadoras, nevera, campana de extracción, centrifugadora, congeladora, entre otras cosas.); consta con dos puertas, una que conecta con el segundo filtro de seguridad y la otra que conecta con el

área recepción de pajillas de semen, almacenamiento de termo de nitrógeno y almacén de inventario. En la continuación del presente proyecto se ira explicando con más detalle esta área.



Figura 41. Área de laboratorio (Autor, 2020)

Adicional al recorrido de las instalaciones, en la primera semana de pasantía la gerente de laboratorio María Fernanda Morales Calvo realizo una explicación sencilla sobre el uso del software proporcionado por la empresa Vytelle (myembryos), el uso de la aplicación (Vytelle – IVF) para la introducción de datos.

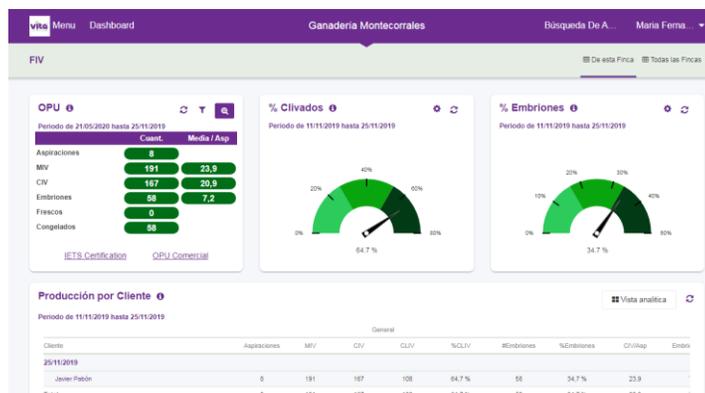


Figura 42. Pestaña principal del software myembryos (Autor, 2020)

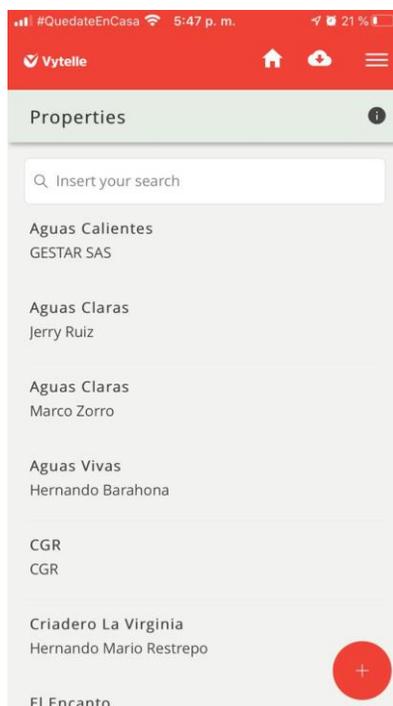


Figura 43. Pestaña principal del app Vytelle – IVF (Autor, 2020)

Del mismo modo la gerente de laboratorio María Fernanda Morales Calvo realizo asignación de tareas sencillas como la recepción de pajillas de semen proveniente de clientes para realización de las FIV, ingreso de la información de las pajillas a planillas de inventario y al software para tener un adecuado control, realizar las etiquetas de lacrados para los embriones congelados, marcación de lacrados para embriones en fresco, realización de inventarios, entre otras cosas.

5.2.1 *Meta*

Segmentar las diferentes áreas de producción en la empresa Vita IVF Lab explicando a su vez los materiales e instrumentaría necesaria para la realización de los procesos y su forma de uso.

5.2.2 *Actividades*

- Reconocimiento de las áreas de producción
- Inducción sobre los materiales a usar en cada área
- Inducción sobre el uso de las maquinas del laboratorio junto a su respectivos valores a tener en cuenta.

5.2.3 *Resultados*

Después de realizar el reconocimiento de todas las instalaciones de la empresa Vita IVF Lab, la pasantía se centró en los procesos de producción de embriones bovinos *in vitro* en el área de laboratorio; se comenzó segmentando las áreas del laboratorio dependiendo de la acción a realizar en cada una de ellas, su división quedo de la siguiente manera:

a) Área de descongelación de pajillas

La presente área está conformada por un termo descongelador de pajillas marca CITO de 12/120 volteos en el cual, como su nombre lo indica, realiza la función de descongelar las pajillas de semen que se utilizaran para realizar la FIV; los implementos adicionales que se

utilizan en esta área son: un (1) termómetro de tarjeta, bolsas de colección de semen marca whirl-pack y agua; para realizar una correcta descongelación de la pajilla, el descongelador de pajillas se llena de agua corriente y limpia (300 ml aproximadamente), se enchufa el cable a la fuente de voltaje correcta (120 volt.), se espera a que el dispositivo caliente el agua a la temperatura adecuada que serían 37°C, el tiempo de espera para que la temperatura llegue a su punto ideal varía dependiendo de la temperatura inicial del agua cuando se introduce en la calentadora (aproximadamente calienta 1.1°C por minuto); se introduce la pajilla de semen recién sacada de nitrógeno líquido a la bolsa whirl-pack, se cierra para que el agua no ingrese a la bolsa y se introduce a la descongeladora dejándola un tiempo de 40 segundos para que se descongele en su totalidad y retirar.



Figura 46. Termo descongelador de pajillas e implementos adicionales (Autor, 2020)

b) Área de centrifugación

La presente área está conformada por una centrifugadora marca minispin para eppendorf, la centrifugación es un proceso utilizado durante el tratamiento del semen dada la necesidad

de aumentar la concentración de los espermatozoides que se concentran en el botón espermático después de la centrifugación (figura 48), el principal uso de la centrifugación en el procesamiento del semen bovino, radica en la necesidad de retirar el plasma seminal (Restrepo, Cantero, & Montoya, 2016); después de descongelar la pajilla de semen en el área de descongelación, 800 μ L de la pajilla se vierten en un tubo eppendorf de 1.5ml, el tubo se introduce a la centrifugadora y esta se enciende a una velocidad de 700 G durante 5 min; terminado el tiempo de espera, se retira el tubo eppendorf de la centrífuga y se retira el botón espermático y es pasado a un segundo eppendorf con medio de fertilización y se introduce en la centrifuga nuevamente durante 3 minutos adicionales a 700 G; después del centrifugado, se retira nuevamente el sobrante dejando al final el botón espermático que se utilizara para realizar la FIV.

Se deben tener siempre en cuenta unas características de seguridad para que la centrifuga trabaje correctamente, entre ellas estan: cerrar correctamente la tapa, ya que la centrífuga solo puede arrancarse con la tapa cerrada correctamente, una vez encendida la centrifuga, la tapa puede abrirse únicamente cuando el rotor se haya detenido; otra característica a tener en cuenta es la detección de desequilibrio de la base sobre la que se encuentra la centrifugadora, ya que si se encuentra desequilibrada la tracción se apagará durante la aceleración o el funcionamiento de la centrífuga y se mostrará el mensaje de error.



Figura 47. Centrifugadora e implementos adicionales (Autor, 2020)

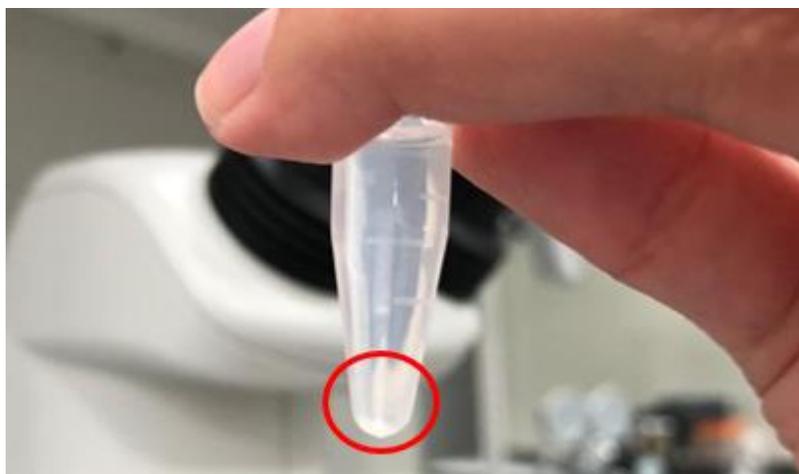


Figura 48. Botón espermático de pajilla sexada (Autor, 2020)

c) Área de producción

Es una de las áreas más importante en la producción de embriones bovinos *in vitro*, está conformada por una cabina de flujo laminar la cual tiene como propósito facilitar un área estéril para evitar contaminaciones en las muestras y los implementos a utilizar; en esta área

hay varios implementos como un estereoscopio, placas calentadoras, calentador de tubos, pipetas (1000 μ L, 100 μ L y 10 μ L) y puntas estériles (1000 μ L, 100 μ L y 10 μ L); El estereoscopio y las placas calentadoras lo único que requiere es conexión al enchufe para funcionar, en el caso de las placas calentadoras estas deben estar a una temperatura constante de 38,5°C.



Figura 49. Área de producción (Autor, 2020)

d) Área de incubadoras

La presente área está conformada por tres (3) incubadoras las cuales son un dispositivo que sirve para mantener y hacer crecer cultivos celulares. La incubadora mantiene la temperatura, la humedad y otras condiciones en grado óptimo, tales como el contenido de dióxido de carbono y de oxígeno en su atmósfera interior; En las incubadoras de la empresa Vita IVF Lab se guarda el material celular desde que entra al laboratorio hasta que pasan a la fase de congelación o sale como embrión fresco (desde que entra el ovocito al laboratorio hasta que llega al día 7) adicional a ello, las incubadoras también almacenan los medios a

utilizarse en los procesos de producción del embrión; los valores que manejan las incubadoras son: 38,5°C de temperatura, 5,0 de Co² y 5,7 O².

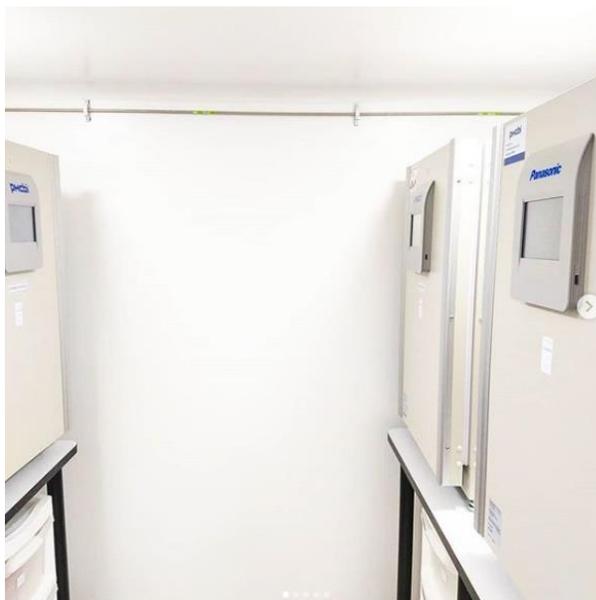


Figura 50. Área de incubadoras (Vita, 2019)



Figura 51. Valores de las incubadoras (Vita, 2019)

e) Área de etiquetado

La presente área está conformada por una laptop y una etiquetadora marca Brady referencia BMP51/53, la laptop posee un programa que ofrece la etiquetadora para realizar las etiquetas de identificación de los embriones; las etiquetas que genera la impresora son dos: etiquetas para gobelets y etiquetas para lacradores, en ambas etiquetas aparecen datos como nombre de la empresa, el proceso, nombre e identificación de la madre, nombre y registro del padre y fecha de congelación; dependiendo del material a etiquetar el cartucho que se utiliza es diferente, en el caso de los gobelets la etiquetadora requiere un cartucho marca Brady referencia MC-1500-595-WT-BK y para los lacradores requiere un cartucho marca Brady referencia M-115-427



Figura 52. Área de etiquetado (Autor, 2020)

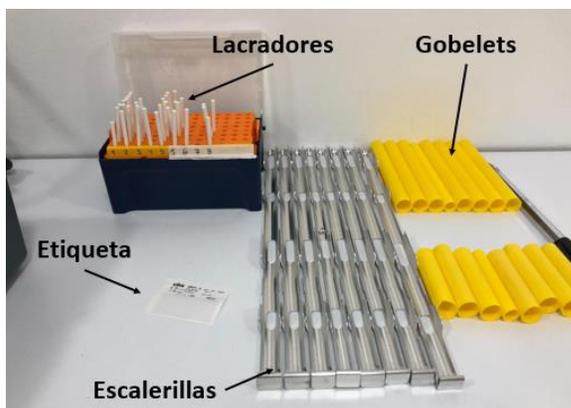


Figura 53. Gobelets, lacradores y etiqueta (Autor, 2020)

f) Área de empaquetado

Esta área cuenta con una pequeña mesa que se coloca cerca del área de producción al momento de empaquetar los embriones, esta área trabaja en conjunto con la cabina de flujo laminar del área de producción; se utilizan implementos como el estereoscopio, jeringa con un adaptador de pajillas , pajillas amarillas para embriones de 0,25cc, lacradores ya marcados en el área de etiquetado y cronometro; si el embrión se venderá en fresco, después del proceso de empaquetado se ingresa en la transportadora para que de esta forma pueda recorrer el trayecto desde el laboratorio hasta el predio del cliente, si por el contrario el embrión se venderá congelado, este pasa a la siguiente área.



Figura 54. Área de empaquetado (Autor, 2020)

g) Área de congelación de embriones

La presente área está constituida principalmente de una congeladora portátil de embriones marca cryologic, la congeladora tiene un sistema de velocidad controlada a base de congelación con nitrógeno líquido diseñados con precisión para la criopreservación de especímenes biológicos. La congeladora consta con una gran variedad de accesorios necesarios para la congelación de embriones, entre ellos están: un controlador de temperatura, cámara criogénica y criobañó. La cámara se encuentra directamente en nitrógeno líquido en el criobañó y está conectada al controlador que regula la temperatura de las muestras; adicional a la congeladora, esta área utiliza otros implementos adicionales como un cronometro y un cotonete largo de algodón.



Figura 55. Área de congelación de embriones (Autor, 2020)

h) Área de almacenamiento de embriones congelados

En el momento en el que los embriones salen del área de congelación, estos son traspasados a una cava de icopor con nitrógeno para almacenarlos en los gobelets anteriormente marcados en el área de etiquetado con los datos específicos del embrión, luego estos son ingresados en los termos de almacenamiento de embriones del laboratorio; el laboratorio consta de tres termos de nitrógeno de 47 litros (Termo A, B y C) en el cual se almacenan los embriones congelados producidos para la venta; los implementos utilizados en esta área son: gobelets, escalerillas metálicas, pinzas metálicas, cava de icopor y gafas protectoras; las observaciones a tener en cuenta son: el tiempo de traspaso del embrión desde la cava de icopor al termo de nitrógeno debe ser el más corto posible, debe evitarse en lo posible realizar movimientos bruscos que puedan afectar a los embriones, el nivel de nitrógeno de los termos debe ser abundante para que cubran completamente los embriones.



Figura 56. Área de almacenamiento de embriones (Autor, 2020)

5.3 Objetivo 3

Evaluar los diferentes procesos empleados para la producción de embriones *in vitro*

5.3.1 Meta

Exponer una explicación clara y detallada de todos los procesos necesarios a nivel de laboratorio para la producción de embriones bovinos *in vitro* en la empresa Vita IVF Lab.

5.3.2 Actividades

- Explicación de los procesos observados en la recolección de ovocitos
- Explicación de los procesos observados en la maduración de ovocitos
- Explicación de los procesos observados en la descongelación y adecuación de semen

- Explicación de los procesos observados en la fertilización *in vitro*
- Explicación de los procesos observados en el cultivo *in vitro* (CIV)
- Explicación de los procesos observados en el clivaje (D4)
- Explicación de los procesos observados en la congelación

5.3.3 Resultados

a) Recolección y maduración de ovocitos bovinos

Los ovocitos son recolectados a través de aspiración folicular en los predios de los clientes. La temperatura a la que se recolectan y almacenan los ovocitos para el transporte debe mantenerse constante en todo momento (37,5 – 38,5°C). Para la búsqueda y maduración de los ovocitos, se deben preparar los siguientes medios:

- Solución salina para la búsqueda de los ovocitos a una temperatura entre 37 – 38°C
- HEPES-TCM-199 (Medio de maduración)
- Criotubos de 2ml (1 tubo por donadora) con 500µL de medio de maduración y 1000 µL de aceite vegetal.

Para minimizar los cambios en el pH y la osmolalidad que puedan ocurrir, se debe Incubar los criotubos a 38,5 ° C, en CO₂ al 6% durante un periodo de 2 h antes de la aspiración.

Procedimiento

Al recibir los ovocitos provenientes de la aspiración folicular, estos son pasados a través de un filtro para quitar el exceso de sangre y fluidos provenientes de la donadora, luego el residuo que queda en el filtro es traspasado con ayuda de solución salina a una placa de Petri de 35mm con líneas guías (marcadas con un bisturí) denominada “placa de búsqueda A” en la cual se realiza la búsqueda con ayuda de un estereoscopio y micropipeta de 10µL de todos los ovocitos para traspasarlos a la placa de búsqueda B, dicha placa es de 35mm con la diferencia de que esta contiene 3 gotas de 50µL del medio de lavado (Oocyte washing) el cual es un medio especial que facilita el lavado de los ovocitos; en la primera gota se colocan todos los ovocitos que se van encontrando en la placa de búsqueda A, en la segunda gota se traspasan los ovocitos de la primera gota quitando toda la suciedad posible, en la tercera gota se colocan los ovocitos de la segunda gota quitando toda la suciedad restante; para finalizar, los ovocitos que quedaron en la tercera gota son contados y clasificados como se especifica en el punto 2.3.4.2.3 para finalmente pasarlos al microtubo de 2ml con el medio de maduración y dejarlos durante un periodo de mínimo 22 y máximo 24 horas en la transportadora y/o incubadora con unas condiciones de 38.5 ° C y 5 - 6% de CO₂.

Detalles a tener en cuenta

- Al preparar los criotubos con el medio de maduración, estos deben ser colocados en la nevera para lograr mantener sus propiedades con unos buenos niveles de pH.
- Colocar los criotubos en la transportadora 2 horas máximo antes de la aspiración de las donadoras.
- Si se da el caso de que un criotubo con el medio de maduración se calentó pero no se utilizó, dicho medio no puede volverse a usar y debe desecharse.
- Los criotubos a utilizar deben ser de fondo cónico para garantizar mejores resultados de maduración, ya que al ser de fondo cónico esto permite que los ovocitos se junten y los ovocitos grado 1 ayuden a madurar a los ovocitos desnudos por compartirles sus células del *cumulus*; otro beneficio de los criotubos de fondo cónico es el que permite que tengan mejor contacto con el calor de la transportadora.

Puntos a observar en la maduración

Después de 22 horas de colocar los ovocitos en el medio de maduración, se debe revisar si se maduraron correctamente, para ello los ovocitos son traspasados a una placa de Petri de 35mm y son observados con ayuda del estereoscopio; lo que se debe tener en cuenta es lo siguiente:

- Las células del *cumulus* de los ovocitos deben estar expandida (**Figura 58**)
- Los ovocitos no deben presentar picnosis.

- El citoplasma debe tener un color homogéneo.

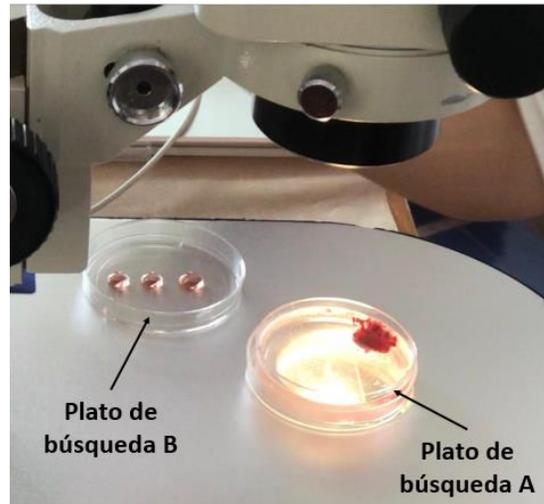


Figura 57. Placas de búsqueda A y B (Autor, 2020)

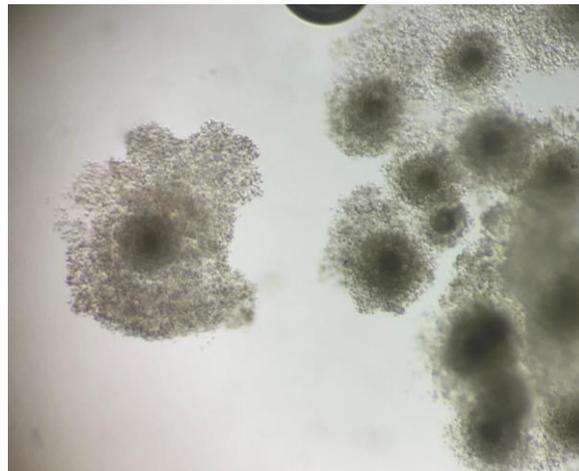


Figura 58. Ovocitos madurados (Autor, 2020)



Figura 59. Criotubo con medio de maduración (Autor, 2020)

b) Descongelación y adecuación de semen

Este proceso se realiza para adecuar el semen que será utilizado en el proceso de fertilización *in vitro* (FIV)

Preparar

- Colocar 500 μ L de sperm gradient (percol) en la incubadora una hora y media antes de la adecuación del semen.
- Colocar 1ml de medio de fertilización en la incubadora una hora y media antes de la adecuación del semen.
- Separa las pajillas de semen congelado que se utilizaran para la FIV.

Procedimiento

Al haber seleccionado las pajillas que indico el cliente para la realización de la FIV, estas pajillas pasan por el área de descongelación de pajillas (**5.2.3 sección a**) durante 30 segundos para pasar las pajillas de estado sólido a líquido; cuando la pajilla se encuentra en estado líquido esta es traspasada a un tubo eppendorf de 1,5ml el cual contenía previamente 500 μ L de sperm gradient y finalmente se lleva al área de centrifugación (**5.2.3 sección b**) durante 5 minutos. La función del sperm gradient es la de separar los espermatozoides muertos y el plasma seminal de los espermatozoides viables, con ayuda de la centrifuga los espermatozoides viables se concentran en el fondo del tubo eppendorf creando el botón espermático.

Después de centrifugar por primera vez el semen, con una pipeta graduada en 50 μ L se retira el botón espermático y se pasa a un segundo tubo eppendorf de 1,5ml que contiene 500 μ L de medio de fertilización, luego dicho eppendorf se introduce nuevamente en la centrifuga durante 3 minutos más; para finalizar, luego de que se saca el segundo eppendorf de la centrifuga se retira el botón espermático y es pasado a un nuevo tubo de 0,5ml y este ya está listo para ser usado en la FIV.

Detalles a tener en cuenta

- Siempre se debe tener en cuenta si la pajilla es sexada o convencional, ya que dependiendo de cuál sea, los valores en la centrifuga y del sperm gradient pueden variar.

- Al momento de la descongelación, cada pajilla debe ir en una bolsa para semen diferente ya que se puede dar el caso de que la pajilla tenga una fisura y esta se riegue en el fondo de la bolsa, si hay más de una pajilla por bolsa se corre el riesgo de confundir el material seminal con la de otro toro.
- Se debe usar una punta diferente para cada proceso.

Puntos a observar en la descongelación y adecuación del semen

Se debe verificar que el semen a utilizar para la FIV tenga buenos niveles de concentración, motilidad, que no se encuentre en mal estado y que no esté sucio.

c) Fertilización in vitro (FIV)

La fertilización *in vitro* (FIV) es una técnica de reproducción asistida que implica la producción de embriones por medios artificiales; este proceso sucede 22 horas mínimo y 26 horas máximo después del proceso de maduración y este consiste en hacer que los espermatozoides fecunden los ahora conocidos como óvulos (ovocitos maduros).

Preparar

- Colocar 3ml de medio washing en la incubadora dos horas antes de la FIV
- Preparar las placas de FIV dos horas antes de la fertilización, dichas placas se preparan en una placa Petri de 35mm, en ella se realizan las divisiones con un sharpie y estas divisiones variaran dependiendo del número de donadoras (máximo 6 gotas por placa);

cada gota debe contener 30 μ L del medio de fertilización (fertilization) y las gotas se recubren con aceite vegetal

Procedimiento

Después de revisar que los ovocitos se hallan madurado correctamente, estos son traspasados a una placa de 100mm la cual se encuentra marcada, con ayuda de un sharpie, con líneas horizontales por cada donadora, en cada línea se encuentra un total de 3 gotas: la primera gota contiene los ovocitos en el medio de maduración, la segunda contiene 100 μ L del medio de lavado (washing) que, como su nombre lo indica, ayuda a lavar los ovocitos y quitarles partes de las células de *cumulus*; y la tercera gota está conformada por 100 μ L de fertilización y en esta se sigue quitando todo el material restante.

Para finalizar, los óvulos son traspasados a unas placas de 35mm denominadas “placas de FIV” (**Figura. 60**) y se procede a añadirles 10 μ L de semen a cada gota para que los espermatozoides fertilicen los óvulos; luego la placa se introduce a la incubadora hasta el día de cultivo (18 horas mínimo y máximo 24 horas después de la fertilización)



Figura 60. Placas de 100mm y placas de 35mm del FIV (Autor. 2020)

Puntos a tener en cuenta

- Por cada gota en la placa de FIV pueden ir máximo 30 ovocitos, si se da el caso de haber más se deben colocar dos gotas.

- El aceite vegetal en las placas de FIV ayuda a proteger a los ovulos de cualquier posible agente externo que pueda entrar a la placa.

- Se debe usar una punta diferente por cada donadora y cada vez que se cambie de medio

- Después de sacar los óvulos del tubo proveniente del campo con el medio de maduración, este tubo es pipeteado y dejado de lado durante todo el proceso de FIV ya que al finalizar el proceso, se revisan nuevamente los tubos de maduración para asegurarse que ningún ovulo se haya quedado en él.

d) Cultivo in vitro (CIV)

El cultivo *in vitro* (CIV) se realiza mínimo 18 horas y máximo 24 horas después de la fecundación *in vitro* (FIV) y esta etapa consiste en limpiar los cigotos y traspasarlos al medio de cultivo

Preparar

- Colocar 5ml de medio de lavado (washing médium) en la incubadora dos (2) horas antes del CIV

- Colocar 5ml de medio de cultivo (culture first step) en la incubadora dos (2) horas antes del CIV

- En una placa de 35mm previamente marcada con la información de las donadoras y toro con el que se cruzó; se colocan por donadora una gota de 50 μ L de medio de primer cultivo (culture first step), luego se llena la placa de aceite vegetal hasta que este cubra las gotas y finalmente se vuelve a colocar otra gota de 50 μ L de medio de primer cultivo (culture first step) sobre la que se colocó previamente (**Figura. 65**). Dichas placas se preparan con dos (2) horas mínimo de anticipación y máximo 16 horas antes del CIV.

- En una placa de 100mm al momento del CIV se colocan 4 gotas por donadora, la primera gota contiene 100 μ L del medio de lavado, la segunda gota contiene 50 μ L de medio de lavado y 50 μ L de medio de cultivo, finalmente la cuarta y quinta gota contienen 100 μ L de medio de cultivo.

Procedimiento

Al haber transcurrido 18 horas mínimo y máximo 24 horas después de la FIV, se revisan las placas en donde se encontraban los ovulos, los cuales después del proceso de fertilización estos pasan a ser cigotos. Al observarlos por primera vez, estos tienden a

estar pegados entre ellos por las células del *cumulus* restantes (**figura . 61**) luego con ayuda de la pipeta de 100 μ L se procede a pipetear los cigotos para que estos suelten los detritos y el resto de células del cumulo que tengan pegados a su zona pelúcida y se tratan de dejar lo más desnudos posibles sin maltratarlos (**Figura. 62**).



Figura 61. Cigotos antes del pipeteo (Autor, 2020)

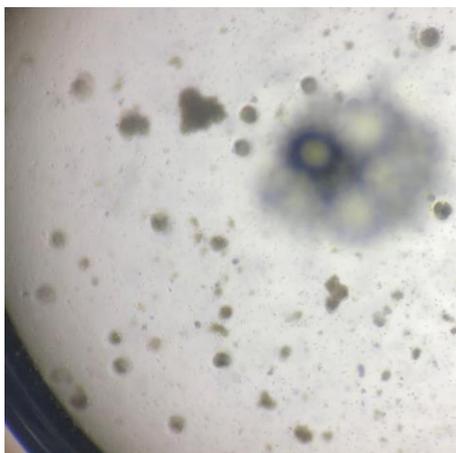


Figura 62. Cigotos después del pipeteo (Autor, 2020)

Después de pipetear los cigotos, estos son traspasados a una placa de 100mm la cual contiene 4 gotas por donadora; la primera gota contiene 100 μ L del medio de lavado que,

como su nombre lo indica, ayuda a lavar los cigotos para quitar los detritos restantes y desnudar los cigotos. (**Figura. 63**) la segunda gota contiene 50 μ L de medio de lavado y 50 μ L de medio de cultivo, esto se hace con el propósito de que los cigotos se vayan adaptando a las concentraciones del medio de cultivo; la tercera y cuarta gota están conformadas por 100 μ L de medio de cultivo cada una, y en esta se sigue quitando todo el material restante (**Figura. 64**).



Figura 63. Cigotos en la primera gota, medio de lavado (Autor, 2020)

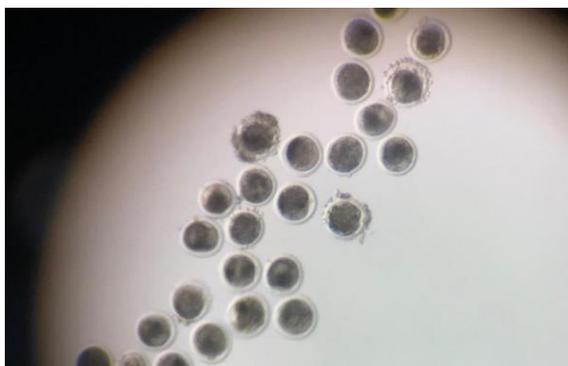


Figura 64. Cigotos en la última gota, medio de cultivo (Autor, 2020)

Para finalizar, los cigotos son traspasados a unas placas de 35mm denominadas “placas de CIV” (**Figura. 65**) y se introducen a la incubadora trigas durante tres (3) días hasta el clivaje (4 días post fertilización).



Figura 65. Placas de cultivo (Autor, 2020)

Detalles a tener en cuenta

- Al pipetear los cigotos para limpiarlos, debe intentarse dentro de lo posible no hacerlo con mucha fuerza y durante mucho tiempo para no perturbarlos
- La incubadora trigas se diferencia de las otras incubadoras en que esta posee unos niveles de oxígeno al 5%, lo cual se asemeja mucho al ambiente del útero de la vaca.
- Este proceso no puede durar más de 30 minutos, ya que los cigotos deben regresar al ambiente de la incubadora para no perturbar su desarrollo.
- Se debe usar una punta de 10 μ L diferente para cada gota.

Puntos a observar en el cultivo

Se debe observar que los cigotos se encuentren en buen estado, que tengan un color homogéneo, que no presenten picnosis y que estén vivos (los cigotos muertos son

descartados y se desechan junto a las células del *cumulus* que quedan en las gotas con el medio de lavado).

e) Clivaje (D4)

Los criterios más utilizados para seleccionar los mejores embriones en las etapas de clivaje está basado en el número celular y la morfología de los embriones en el día 4 post fertilización.

Preparar

- Colocar 1ml de medio de cultivo (culture second step) en la incubadora una (1) hora antes del clivaje
- En una placa de 35mm previamente marcada con la información de las donadoras y toro con el que se cruzó; se colocan por donadora una gota de 50 μ L de medio de segundo cultivo (culture second step), luego se llena la placa de aceite vegetal hasta que este cubra las gotas y finalmente se vuelve a colocar otra gota de 50 μ L de medio de second cultivo (culture second step) sobre la que se colocó previamente **(Figura.66)**. Dichas placas se preparan con dos (2) horas mínimo de anticipación y máximo 16 horas antes del clivaje

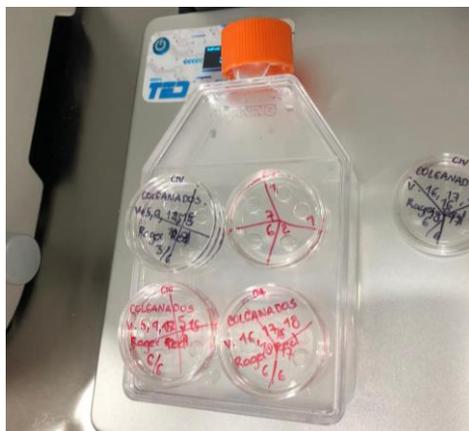


Figura 66. Placas de clivaje (Autor, 2020)

Procedimiento

El presente proceso se realiza 4 días después de la fertilización y consta en observar cuales cigotos lograron realizar correctamente la divisiones en forma de blastómeros y pasa a denominarse embrión en sus primeros estadios de división celular; en el clivaje se procede a pasar los embriones que lograron dividirse correctamente (4 blastómeros o más) de la placa de cultivo (CIV) a la placa de clivaje (D4), dicha placa es de 35mm similar a la del cultivo, con la diferencia de que este tiene un medio denominado “culture second step” el cual le proporciona nuevos nutrientes para que continúe su desarrollo.

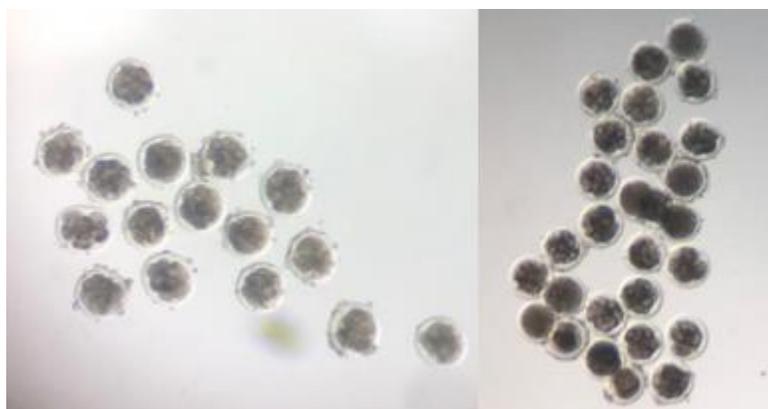


Figura 67. Embriones en los primeros estadios entre 8 a 16 células (Autor, 2020)***Detalles a tener en cuenta***

- A diferencia del cultivo, el clivaje se traspasa directamente de la placa de cultivo (CIV) a la placa de clivaje (D4).
- Si el embrión posee menos de 4 blastómeros se desecha.

Puntos a observar en el clivaje

- El embrión no debe presentar picnosis.
- El embrión debe estar bien dividido.
- Las divisiones de los blastómeros deben ser iguales y verse claras a través del estereoscopio.

f) Empaquetado y congelación de embriones

Esta tecnología permite criopreservar los embriones FIV de manera individual y utilizarlos en el momento que se requiera con la misma facilidad que al utilizar una pajilla de semen, desde su implementación esta técnica ha tenido amplia aceptación y ha sido utilizada a gran escala tanto en proyectos comerciales privados como gubernamentales con resultados exitosos.

Preparar

- Una hora antes de realizar la congelación se introduce 10ml de medio de transporte (transportation médium) en la incubadora.
- Una hora antes de realizar la congelación se introduce 3ml de medio de primera congelación (first freezing) en la incubadora.
- Una hora antes de realizar la congelación se introduce 3ml de medio de segunda congelación (second freezing) en la incubadora.
- Encender la congeladora 15 minutos antes de introducir la pajilla con los embriones.

Procedimiento

Lo primero a realizar antes de iniciar la congelación es revisar la placa de clivaje en donde se encuentran los ahora llamados embriones y se procede a contar únicamente los embriones que se encuentran en etapa Bx (**5.3.5.2 sección d**) código 1 (**2.3.5.3. sección a**), después de realizar el conteo la cantidad de embriones por donante se anotan en la planilla de congelación de embriones (**Figura 68**) y se adecuan los lacrados y gobelets necesarios en el área de etiquetado (**5.2.3. sección e**).

		VITA IVF LAB SAS NIT.901.323.876 -1		Código	FR-LA-09-V01		
		Almacenamiento de embriones congelados		Fecha de Vigencia	Mayo 06 de 2020		
				Aprobado Por	Director Ejecutivo		
				Página	1/1		
Cliente:		Finca:	Proceso:	Color tab:			
Fecha de congelación:		Tanque:	Canasta:	Responsable:			
Numero de donante	Escalerilla	Sesión 1 Día	Sesión 2 Día	Sesión 3 Día	Sesión 4 Día	Sesión 5 Día	Total
		1	1	1	1	1	
		2	2	2	2	2	
		3	3	3	3	3	
		4	4	4	4	4	
		5	5	5	5	5	
TOTAL							
Observaciones:							

Figura 68. Planilla de congelación de embriones (Autor, 2020)

Al tener listos los lacradores y gobelets, se procede a tomar una placa de 100mm y marcar con sharpie una hilera horizontal por donadora, luego por cada donadora se colocan un total de cuatro gotas (**Figura 69**); la primera gota contiene medio de transporte el cual le aporta alimento y nutrientes a los embriones mientras se preparan las siguientes gotas en la placa, la segunda gota está conformada por el medio first freezing el cual tiene la función de deshidratar el embrión completamente, la tercera y cuarta gota están conformadas por el medio second freezing el cual tiene la función de volver a hidratar los embriones con el medio y este los ayuda a conservarse durante el proceso de congelación y el tiempo que se tendrán almacenados.



Figura 69. Placa de 100mm para congelación (Autor, 2020)

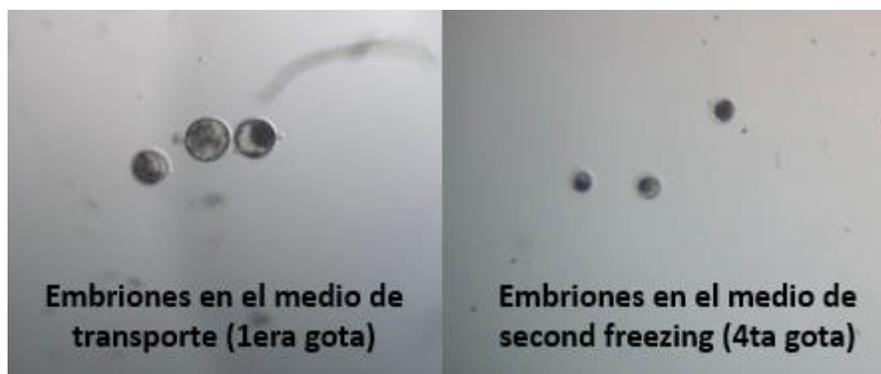
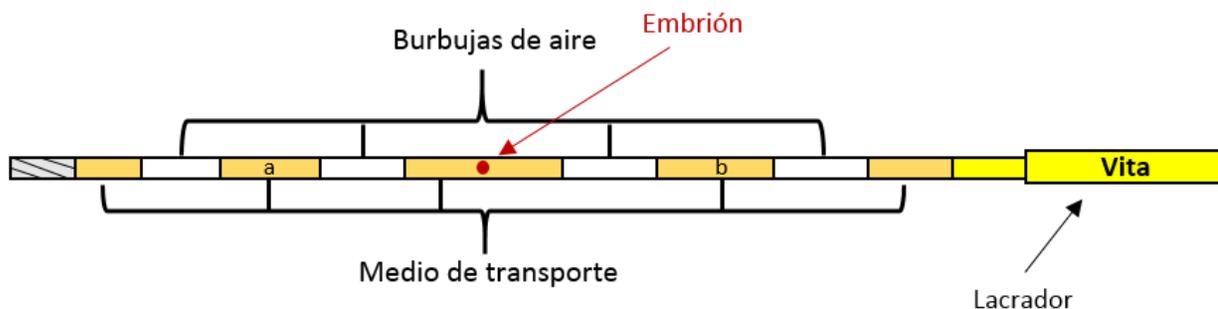


Figura 70. Embriones en la placa de 100mm para congelación (Autor, 2020)

Cuando el embrión se encuentra en la última gota de la placa de 100mm, se procede a envasar cada embrión en una pajilla de 0,25ml de acuerdo al siguiente esquema (**Figura 71**).



a - b: puntos a realizar el seeding

Figura 71. conformación de pajilla para congelación de embriones (Autor, 2020)

Después de terminar de envasar los embriones en las pajillas, se procede a introducir las pajillas en la congeladora que se encuentra en el área de congelación de embriones (5.2.3 sección g) se debe tener en cuenta que al momento de introducir las pajillas, la congeladora debe estar en una temperatura de $-07,0$ grados centígrados; dos minutos después de introducir los embriones en la congeladora, se procede a realizar el seeding, dicho proceso consiste en congelar los puntos a y b señalados en la **figura 71** con ayuda de un cotonete anteriormente sumergido en nitrógeno (**Figura 72**), esto se hace con el propósito de proteger el embrión dándole más resistencia durante el proceso de congelación; para finalizar se espera a que la congeladora se encuentre en una temperatura de $-35,1$ grados centígrados y se procede a sacar los embriones y pasarlos al área de almacenamiento de embriones (5.2.3 sección h) para almacenarlos hasta que el cliente los retire.

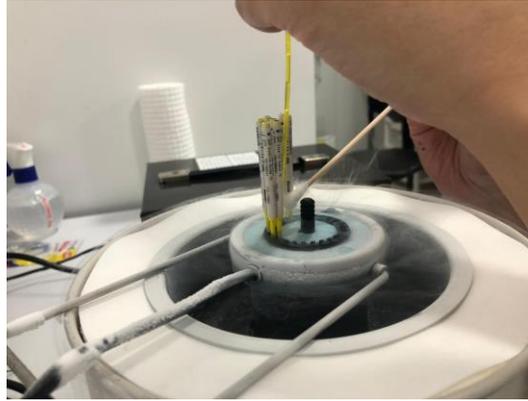


Figura 72. Seeding (Autor, 2020)

Detalles a tener en cuenta

- A partir de la segunda gota, los embriones tienen un periodo de 10 minutos exactos para ser introducidos en la congeladora.
- Cuando el embrión se encuentra en la segunda, tercera y cuarta gota hay que darles bastantes vueltas con la pipeta para que estos se impregnen completamente del medio.
- Al introducir las pajillas en la congeladora, se debe asegurar que se encuentren dos pajillas por cada orificio ya que esto ayuda a que la pajilla choque con las paredes de la congeladora y congelen apropiadamente.
- Todas las pajillas deben introducirse en la congeladora antes de que empiece a actuar la curva de congelación (alrededor de 40 minutos desde que se enciende la maquina).
- La congeladora debe tener buen nivel de nitrógeno en todo momento.

- Cuando se realiza el seeding, se debe asegurar que este se haga en el orden en que las pajillas se introdujeron en la congeladora.
- Se debe tener mucho cuidado de no realizar el seeding en el área donde se encuentra el embrión.
- Antes de introducir las pajillas en la congeladora, con ayuda de un sharpie se marcan las áreas donde se realizara el seeding para que sea más fácil de realizar.

Puntos a observar en la congelación

- Se debe observar que los embriones que se van a congelar tengan un buen botón embrionario y que sean blastocistos código 1.
- Se debe observar que la congeladora disminuya un (1) grado cada medio minuto hasta que este llegue a una temperatura de -35,1 grados centígrados

5.4 Actividades adicionales

A continuación se presentan unas actividades adicionales que se realizaron en el transcurso de la pasantía para lograr realizar un adecuado diagnóstico de la empresa Vita IVF Lab

5.4.1 Actividades

- Evaluación de los precios de venta de embriones en fresco y congelados.

- Elaboración de un diagnóstico productivo de la empresa Vita IVF Lab.
- Elaboración de un análisis DOFA, a partir de la información recopilada durante el reconocimiento de la empresa.

5.4.2 *Resultados*

a) Precios de embriones congelados y en fresco

En la empresa Vita IVF Lab se venden los embriones en dos presentaciones, congelados y en fresco; el cliente esta encargado de colocar todo el material genético (pajillas de semen congelado y las donadoras para la aspiración de los ovocitos), adicional a ello el cliente debe costear los traslados de los trabajadores de la empresa que realizaran la aspiración y la búsqueda de los ovocitos al predio donde se encuentran las donadoras; una vez que todo el material genético se encuentre en el laboratorio, se procede a producir el embrión; después de 7 días cuando ya está listo el embrión para la venta, este tiene un precio de 120.000 pesos colombianos el embrión fresco y de 180.000 pesos el embrión congelado.

b) Diagnostico productivo

- **Propósito de la empresa.** Producción de embriones bovinos *in vitro*.

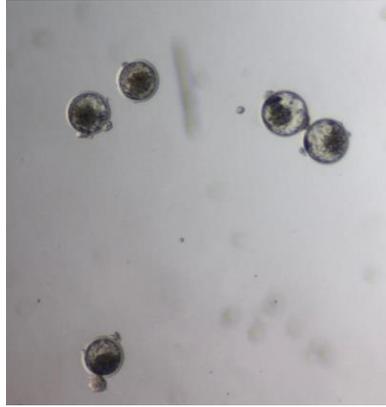


Figura 73. Embriones bovinos (Autor, 2020)

- **Limite.** La empresa Vita IVF Lab se encuentra ubicada en la ciudad de Bogotá, barrio cedritos dirección 144 # 22 – 22 a una (1) cuadra de la autopista Norte; la empresa está constituida por una casa de dos pisos que se encuentra en un área total de 10 x 25 mts en la cual se encuentran todas las áreas mencionadas en el punto 5.1.3.



Figura 74. Fachada externa de la empresa Vita IVF Lab (Google Maps, 2020)

- **Entorno.** La empresa Vita Ivf Lab se encuentra a una altitud de 2650 m s. n. m. con una temperatura promedio de 13°C y una humedad relativa de 81%; a sus alrededores se encuentran casas familiares.

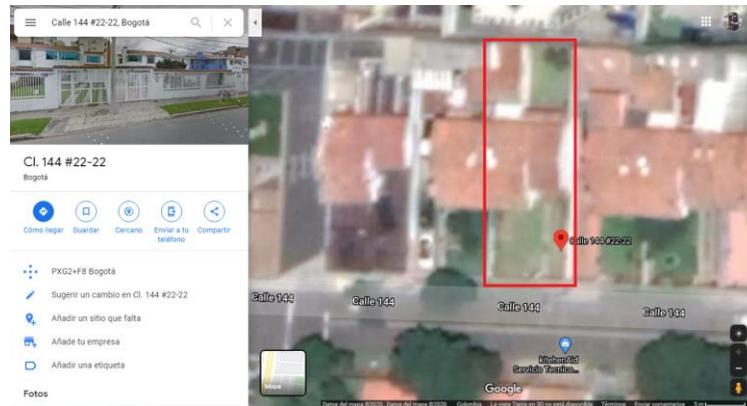


Figura 75. Vista satelital de la empresa Vita IVF Lab (Google Maps, 2020)

- **Interacciones.** La empresa Vita IVF Lab maneja los siguientes parámetros productivos desde el 12 de Febrero (fecha de inicio de la pasantía) hasta la fecha actual (31 de Mayo del 2020).
 - Una media de 24,9 ovocitos madurados por donadora.
 - Un 65,7% de embriones clivados en relación con los valores obtenidos en el MIV (maduración de ovocitos) de todas las granjas.

- Un 24,7% de embriones producidos en relación con los valores obtenidos en el MIV (maduración de ovocitos) de todas las granjas.
- Un 2% de pérdidas en relación al porcentaje de embriones producidos.
- Una media de 6,6 embriones producidos en promedio por donadora.
- Una media de 1 pajilla de semen convencional de 0,5cc por cada 20 – 25 donadoras.
- Una media de 1 pajilla de semen sexado de 0,25cc por cada 10 – 15 donadoras.



Figura 76. Porcentajes de producción (Autor, 2020)

- **Recursos.** El laboratorio de la empresa Vita IVF Lab cuenta con termos de nitrógeno líquido, incubadoras, nevera, termómetros, cronómetros, congeladoras, etiquetadoras, descongelarla de pajillas, centrifugadora de eppendorfs,

transportadoras, esteroscopio, placas calentadoras, campana de extracción, calentadores de tubos, cilindros de nitrógeno y cilindros de Co²

- **Ingresos.** A la empresa Vita IVF Lab entra una gran variedad de insumos para la producción de embriones bovinos *in vitro*, entre ellos están:

- **Material genético.** pajillas de semen con un promedio de 12 pajillas semanales y ovocitos recolectados en las aspiraciones, las cuales son en promedio 3 aspiraciones semanales (la cantidad de ovocitos varía dependiendo de varios factores como raza, edad, nutrición, entre otros de las donadoras)

- **Materiales de laboratorio.** Son materiales que se utilizan en la producción de embriones como: puntas de pipetas (10 µL, 100 µL y 1000 µL), criotubos de varios tamaños (2ml, 25ml y 50ml), placas de Petri de diferentes tamaños (35mm, 60mm y 100mm), lacradores (amarillos, blancos, rojos y azules), gobelets (10mm y 13mm), escalerillas (10mm y 13mm), tabs, agua destilada, alcohol al 90%, cartuchos de etiquetas, cotonetes, Oosafe, pajillas de 0,25cc, medios para la producción de embriones provenientes de Vytelle (medio de maduración, freezing, entre otros), cofias, guantes y polainas.

- Materiales de campo.** capsulas de Petri de diferentes tamaños (35mm y 60mm), puntas de 1000 µL y 10µL, líneas OPU, aguja de OPU, camisa para guía de OPU, papel kraft, gel de ultrasonido, solución salina, guantes de latex talla S y M, guantes de palpación y medicinas como heparina y lidocaína

- **Salidas.** De la empresa Vita IVF Lab salen materiales de campo que son gastados en los predios donde se realizan las aspiraciones y búsqueda de los ovocitos, salen embriones en fresco y embriones congelados.

c) Análisis DOFA

Tabla 1.

Matriz Dofa de la Empresa Vita IVF Lab.

	Positivo	Negativo
	Fortalezas	Debilidades
Origen Interno	<ul style="list-style-type: none"> - Instalaciones aseadas que evitan la contaminación en los medios. - Empleados con buena experiencia en las áreas productivas (laboratorio y campo) 	<ul style="list-style-type: none"> - Áreas de trabajo pequeñas que impiden el libre movimiento. - Poca cantidad de almacenamiento para los embriones que se producen en el laboratorio. - Poca cantidad de empleados.
	Oportunidades	Amenazas
Origen externo	<ul style="list-style-type: none"> - La empresa se encuentra en un área muy conocida de Bogotá con buenas vías de acceso. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cuarentena obligatoria por motivos de la pandemia Covid-19.

-
- Cercanía a diferentes locales como bancos (Bancolombia, BBVA, Colpatria, entre otros), restaurantes, supermercados, entre otros.
 - Cercanía al sistema de transporte Transmilenio (1 cuadra).
-



Figura 77. Limpieza de termos de almacenamiento (Autor, 2020)

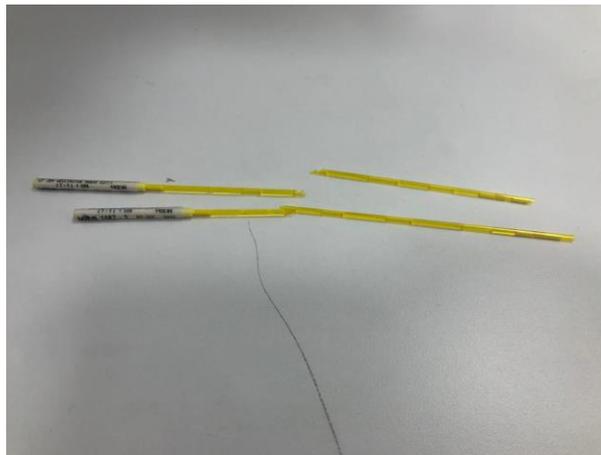


Figura 78. Embriones perdidos por caerse al fondo del termo (Autor, 2020)

Capítulo 6. Conclusiones

En el presente proyecto de pasantía enfocado en la producción de embriones bovinos *in vitro* en la empresa Vita IVF Lab se logró concluir que los procesos empleados por la empresa permite disponer de un gran número de embriones bovinos en diferentes estadios de desarrollo los cuales son destinados para la venta en fresco o congelado. El método abre además la posibilidad de producir embriones de vacas de alto valor genético y en combinación con las exitosas técnicas de congelación se presentan nuevos aspectos en la conservación de reservas genéticas de razas de alto valor genético o en vías de extinción.

Con el diagnóstico realizado a la empresa, se logró identificar que una de las deficiencias de la empresa Vita IVF Lab a nivel de laboratorio está asociada al tamaño de sus instalaciones, lo cual a pesar de que no influye en la producción del embrión, limita la movilidad y el orden de las áreas, facilitando el desorden e incomodidad de los trabajadores; otro punto a tomar en cuenta es la falta de termo de almacenamiento para embriones congelados, lo que da como resultado la dificultad al momento de almacenar los embriones congelando facilitando posibles errores y pérdidas como la caída de embriones al final del termo (**Figura 78**)

Se logro avanzar en procesos para obtener la certificación de las buenas prácticas de bioseguridad (BPB) para las centrales de recolección y procesamiento de material genético de especies de interés zootécnico generado por el ICA, sin embargo los procesos se vieron retrasados por una amenaza de carácter externo indicado en la matriz DOFA lo cual fue la pandemia del Covid-19 que genero una cuarentena total en Colombia.

Capítulo 7. Recomendaciones

Es necesario ampliar las áreas del laboratorio para mayor facilidad y orden al momento de trabajar, lo cual lograría evitar acumulación de objetos y posibles errores futuros; también se recomienda ampliar el inventario de termos de almacenamiento, ya que al avanzar el tiempo la empresa tiende a obtener más clientes y por ende mas embriones producidos que no tendrán espacio para ser almacenados en la empresa.

De igual forma, se recomienda que cuando termine la cuarentena implementada por el gobierno Colombiano como medida preventiva contra la pandemia del Covid-19, se retomen nuevamente los procesos necesarios para la certificación de las buenas prácticas de bioseguridad (BPB) para las centrales de recolección y procesamiento de material genético de especies de interés zootécnico generado por el ICA.

Capítulo 8. Referencias

Filipiak, Y. (Marzo de 2010). ResearchGate. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/230801504_Manual_de_Fertilizacion_In_Vitro_en_Bovinos

Jones, A. L. (Enero de 2008). scienceDirect. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X07005547?via%3Dihub>

López, J. A. (Junio de 2016). UAEM. Obtenido de Universidad Autonoma del Estado de Mexico: <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/49812>

Portilla, C. (14 de Julio de 2016). CONtextoganadero. Obtenido de <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/cuanto-vale-producir-un-embrión-bovino>

Olaya, J. (03 de Diciembre de 2014). CONtextoganadero. Obtenido de <https://www.contextoganadero.com/internacional/mejoramiento-genetico-animal-el-futuro-de-la-ganaderia>

Ahedo, J. M. (2017). *CONAFE*. Obtenido de <http://www.conafe.com/calificacion.aspx>

Alberio, R. (2017). *reprobiotec*. Obtenido de http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_02.pdf

Antonio, V. C. (2017). *Universidad de las Fuerzas Armadas* . Obtenido de

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/12958/1/T-ESPE-002798.pdf>

Banegas, J. C., & Peralta, E. M. (Diciembre de 2007). *Manual de procedimientos para el*

laboratorio de transferencia de embriones en bovinos . Obtenido de Genetic Resources

International: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/758/1/T2520.pdf>

Baril, & Brebion. (1995). *Manual de Formacion Practica para el Transplante de Embriones en*

Ovejas y Cabras. Francia: Roma.

Becaluba, F. (2007). *Produccion animal* . Obtenido de <http://www.produccion->

[animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/17-superovulacion.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/17-superovulacion.pdf)

Bielanski, A., & Yadav, B. R. (October de 1990). Obtenido de Cambridge University Press:

<https://www.cambridge.org/core/journals/animal-science/article/note-on-fertilization-and-embryo-production-in-superovulated-cattle-with-various-levels-of-subcutaneous-fat-tissue/876FB1634A3B95C55A166F41386609E8>

Cabrera. (2020). *ANEMBE*. Obtenido de <http://www.anembe.com/congresos/2002p/p18.htm>

Carillo, D., Lenis, Y., & Rodriguez, N. (Julio de 2014). *Conceptos básicos de desarrollo*

embrionario en la vaca. Obtenido de ResearchGate:

https://www.researchgate.net/publication/263389285_Conceptos_basicos_de_desarrollo_embriionario_en_la_vaca

Caso, M. E. (1977). Ciencia y tecnica de los equinodermos en relacion con el hombre primera parte. Aspecto cientifico . *Anales del centro de ciencias del mar y limnologia*, 1.

Castro. (2009). *Universidad Nacional Agraria*. Obtenido de <https://repositorio.una.edu.ni/1381/1/tnl53c355.pdf>

Cavalieri, Morotti, & Seneda. (2018). Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian. *Elsevier*, 57-60.

Chang, M. C. (1 de Enero de 1968). *Oxford Academic* . Obtenido de https://academic.oup.com/jas/article-abstract/27/suppl_1/15/4781476?redirectedFrom=PDF

Cogas. (2019). *Cogas Ltda*. Obtenido de Colombiana de Gases: <https://www.cogasltda.com/>

consideraciones Para en el momento de seleccionar un vientre receptor para la FIV. (08 de Enero de 2020). Obtenido de Hacienda el Cucharo: <https://www.haciendaelcucharo.com/post/selecci%C3%B3n-de-receptoras>

Contreras, F. B., & Corona, A. C. (Junio de 2010). *Evaluación de la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica bos taurus y bos indicus*. Obtenido de Scielo:

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300007

Feugang, J. M., Rodríguez, O. C., & Erdogan, M. (2009). Culture systems for bovine embryos. *Elsevier*, 141-149.

Gardón, J. C. (2000). *Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos*. Obtenido de Universidad de Cordoba :

<https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/407/13079219.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

Garzon, N., Urrego, R., & Giraldo, C. (Enero de 2007). *ResearchGate*. Obtenido de

https://www.researchgate.net/publication/275034436_Algunos_fActores_que_AfectAn_los_trAtAmientos_de_superovulAcion_en_lA_trAnsferenciA_de_embriones_bovinos_Some_factorS_affecting_Superovulation_treatmentS_in_cattle_embryo_tranSference

Garzón, N., Urrego, R., & Giraldo, C. A. (31 de Octubre de 2017). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Obtenido de

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428098008>

Gibbons, A., & Cueto, M. (2013). *Manual de Transferencia de Embriones en Ovinos y Caprinos*.

Obtenido de INTA: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/28-MANUAL.pdf

Hansen. (2013). *The Big Book of Bovine Embryos*. Florida: florida, University .

Instituto Colombiano Agropecuario. (2016). Obtenido de ICA:

<https://www.ica.gov.co/normatividad/normas-ica/resoluciones-oficinas-nacionales/2016/2016r20033>

Jiménez. (2009). *Universidad Nacional de Colombia*. Obtenido de

<file:///C:/Users/Kerly/Desktop/13769-41299-1-PB.pdf>

Larson, R. (2016). *Bovine Theriogenology*. Pennsylvania: ELSEVIER.

Leman, & Dziuk. (14 de Enero de 1971). *Reproduction*. Obtenido de

https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/26/3/jrf_26_3_018.xml

López, S. R. (Enero de 2010). *ResearchGate* . Obtenido de

https://www.researchgate.net/publication/260359949_Ovum_Pick_Up_OPU_en_bovinos_Aplicaciones_en_Biotecnologia_de_la_Reproduccion

Mapletoft. (Septiembre de 2013). *Evaluation and classification of bovine embryos*. Obtenido de

Anim. Reprod:

[http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v10n3/p344-348%20\(AR628\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v10n3/p344-348%20(AR628).pdf)

Mapletoft, R., & Hasler, J. (2005). Obtenido de

<https://pdfs.semanticscholar.org/3e65/518ee0aaff0cc9ab7177a343fc8ec5631e2d.pdf>

Moreno. (2004). Transferencia de embriones en bovinos. En Moreno, *Transferencia de embriones en bovinos* (pág. 97). Texas.

Morris, D. G., J. M. G., & Sreenan, M. (Enero de 2002). *ResearchGate*. Obtenido de

https://www.researchgate.net/publication/237343633_Viability_of_in_vitro_produced_cattle_embryos

Nava, Hernandez, H. y., & Hugo. (2005). Aspiracion Folicular Transvaginal. En N. T, H. y. F, & Hugo, *Aspiracion Folicular Transvaginal* (págs. 611-614). Maracaibo, Venezuela.

Palma. (2010). *Biotecnología de Reproducción. Evaluación morfológica de los embriones*.

Obtenido de E-books : <http://www.reprobiotec.com>.

Palma, G. A. (20 de Febrero de 2018). *ResearchGate*. Obtenido de

file:///C:/Users/Kerly/Documents/10%20mo%20semestre%20zootecnia/Captulo09Transferenciadelosembriones_palma.pdf

Pelaez, V. A. (2011). *Repositorio Institucional Universidad de Cuenca*. Obtenido de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>

Peña, M. Á. (30 de Junio de 2016). *CONtextogadero*. Obtenido de <https://www.contextogadero.com/ganaderia-sostenible/superoovulacion-un-proceso-para-obtener-mas-embriones-bovinos>

Quispe, C., Ancco, E., & Solano, J. (2018). *scielo*. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v29n4/a04v29n4.pdf>

Ramos, J. L. (2011). *Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro*. Obtenido de http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3172/2929_JUAN%20LUIS%20VILCHIS%20RAMOS.pdf?sequence=1

Restrepo, G., Cantero, J., & Montoya, J. (Junio de 2016). *Efecto de la centrifugación sobre la integridad y la funcionalidad de espermatozoides equinos*. Obtenido de scielo: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v14n1/v14n1a15.pdf>

Sedena. (2005). *Aspiracion de ovocitos por ultrasonografia transvaginal y produccion de embriones*. Brasil: Central de Biotecnologia, Morgi Mirin.

Selk, G. (2002). *Oklahoma Cooperative Extension Service*. Obtenido de

https://shareok.org/bitstream/handle/11244/49938/oksd_ansi_3158_2002-09.pdf?sequence=1

Shelton, J. N. (22 de Noviembre de 2011). *ResearchGate*.

Silva, J., Alvarez, R., Zanenga, C., & Pereira, G. (September de 2009). *Animal Reproduction* .

Obtenido de <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6070f7783717068b4775/pdf/animreprod-6-3-440.pdf>

Suaznabar, V., & Maribel, E. (2018). *Universidad Nacional del Centro de Peru* . Obtenido de

<http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/4850/Vilcatoma%20Suzanabar.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Suaznabar, V., & Maribel, E. (2018). *Universidad Nacional del Centro del Perú*. Obtenido de

<http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/4850/Vilcatoma%20Suzanabar.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Transferencia en blastocisto. (2017). Obtenido de Tambre:

<https://clincatambre.com/transferencia-en-blastocisto>

Troxel, T. R. (s.f.). *Embryo Transfer in Cattle*. Obtenido de University of Arkansas :

<https://www.uaex.edu/publications/PDF/FSA-3119.pdf>

Valladares, J. A. (Julio de 2010). *Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo*. Obtenido

de

https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/35697203/TRANSFERENCIADEEMBRIONESENBOVINOSREVISION.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DTransferencia_de_Embriones_en_Bovinos._R.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=ASIAT

Waltero, É. M., & Dias, A. J. (24 de Abril de 2013). Obtenido de

<file:///C:/Users/Kerly/Desktop/545-Texto%20del%20art%C3%ADculo-1121-1-10-20140425.pdf>

Whittingham, D. G. (9 de Noviembre de 1968). *Nature*. Obtenido de

<https://www.nature.com/articles/220592a0>

Youngquist, R., & Threlfall, W. (2007). *Large Animal Theriogenology*. Missouri: Saunders

Elsevier.