



MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN APLICADA

Programa Elaborado por:

Dr. Rafael Cano Torres
Dra. Yazmin Elizabeth Felipe Pérez

Programa Revisado por:

MVZ Bulmaro Valdez Ramírez
M. en C. Arturo Víctor Gómez González

Aprobado por los H.H. Consejos Julio 2013





I. CONTENIDO

	Página
II. PRESENTACIÓN.	3
III. ESTRUCTURA DE LAS PRÁCTICAS.	4
SECCIÓN A. PRÁCTICAS	
1. Evaluación de la calidad seminal.	5
2. Evaluación y Obtención de ovocitos.	16
SECCIÓN B. ANEXOS	
Apéndice: Preparación de Reactivos y Soluciones	22
IV. BIBLIOGRAFÍA.	23
V. ACTUALIZACIÓN.	25





II. PRESENTACIÓN

La unidad de aprendizaje de reproducción aplicada incluye diferentes tópicos enfocados hacia la evaluación de diferentes individuos para ser seleccionados como sementales o vientres en las diferentes especies de animales domésticos.

Entre los procedimientos más importantes durante la selección de reproductores se incluye la evaluación de gametos y derivado de dicha evaluación se recomienda o no su empleo para que se apliquen las diferentes técnicas de reproducción asistida.

Por lo anterior, se incluye en las prácticas de laboratorio la evaluación de la calidad espermática y de ovocitos, a través del uso de técnicas sencillas, adaptables a la infraestructura y equipo disponible en el laboratorio de prácticas de la propia facultad.





III. ESTRUCTURA DE LAS PRÁCTICAS

Número y título de la práctica

- 1.1 Introducción
- 1.2 Objetivo
- 1.3 Materiales a utilizar
- 1.4 Técnicas a seguir
- 1.5 Resultados
- 1.6 Lectura e interpretación





SECCIÓN A: PRÁCTICAS

Práctica 1: Evaluación de la calidad seminal

1.1 Introducción

En muchas ocasiones los machos de las diferentes especies son seleccionados en base a su pedigree, a los registros de sus ancestros (por su “buena calidad genética”), además de su conformación o fenotipo; sin embargo, tales características no garantizan que dichos animales produzcan gametos que sean capaces de dejar a las hembras preñadas. Por lo que de manera rutinaria es necesario realizar evaluaciones de la calidad seminal de los machos, especialmente de aquellos en los que no se tienen registros de su desempeño a través del número de crías que han podido dejar, como las pruebas de progenie, o bien, cuando se trata de machos primerizos.

El gameto masculino o espermatozoide es el producto final del proceso de gametogénesis en el macho, misma que ocurre dentro de los testículos. Los espermatozoides tienen como destino el transportar el material genético del macho hasta el sitio de fertilización dentro del tracto genital femenino e interactuar eficientemente con el ovocito para lograr la fecundación y así para lograr la creación de un nuevo individuo. Para ello, deben mantener las características de óptima funcionalidad que les permitan un buen desplazamiento, mantener sus estructuras internas y externas intactas, de tal manera que se pueda garantizar una buena capacidad fecundante.





Por lo anterior se hace necesario el evaluar la calidad seminal de los diferentes machos que han sido seleccionados como sementales, para con ello garantizar que sus gametos son de buena calidad, y pueda recomendarse su empleo ya sea para la monta natural o para la inseminación artificial, usando el semen fresco, diluido o incluso congelado-descongelado.

1.2 Objetivo

Realizar la evaluación seminal para que al finalizar la práctica el discente sea capaz de determinar si es recomendable o no el utilizar al macho como semental para realizar el apareamiento por monta natural o la inseminación artificial.

1.3 Materiales a utilizar

Material Biológico

- Muestra seminal, en un recipiente graduado que lo proteja de la luz solar y lo mantenga a una temperatura entre 25 y 35°C

Material de Laboratorio

- Pipetas Pasteur (atemperadas)
- Porta y cubre objetos (atemperados)
- Perilla para pipetas
- Guantes de látex
- Baño María de 35 a 37°C
- Microscopio óptico
- Tinción vital (Eosina- Nigrosina)
- Solución Salina Formolada (0.1%)
- Cámara de Neubauer
- Micropipetas para 10-100 μ l
- Puntas amarillas 10-100 μ l





Condiciones de la práctica

La práctica se desarrollará en el laboratorio de prácticas de la FMVZ, UAEMex.

Los discentes portarán bata blanca para uso de laboratorio, preferentemente de algodón, se acatarán las normas de comportamiento del laboratorio de prácticas, así como los lineamientos de uso del mismo.

Los discentes, en todo momento, tendrán que observar un comportamiento digno y respetuoso, tanto para sus compañeros como para el personal y profesores a cargo de la práctica.

Los discentes deberán tener el conocimiento previo de la extracción de semen para la especie que se haya seleccionado para realizar la evaluación seminal.

Los discentes deberán tener el conocimiento previo del uso del microscopio óptico.

La muestra seminal será obtenida de acuerdo a las recomendaciones para cada especie, y se transportará al laboratorio en un medio que la proteja de los cambios de temperatura y de la luz solar.

1.4 Técnica a seguir

La evaluación de la calidad espermática es conformada por dos componentes, la evaluación macroscópica y la microscópica, que en conjunto permitirán emitir un diagnóstico respecto a la calidad de la muestra seminal.

Primeramente es necesario que el recipiente graduado con la muestra seminal sea colocado dentro del termo baño o baño María, previamente atemperado a 37°C, mismo que debe estar ubicado lo más cercano posible al microscopio. El microscopio debe ser previamente enfocado a la altura en la cual se realizará la observación de la muestra, de modo que no se pierda tiempo en enfocarla, puesto que se irá enfriando la muestra y en consecuencia se observará una motilidad espermática menor. Lo ideal es tener el equipo disponible justo en el sitio en donde se realiza la recolección seminal, para evitar que el transporte hasta el laboratorio altere los parámetros a ser evaluados.

Evaluación macroscópica

Comprende la evaluación de la muestra de semen a partir de lo que es observable con el ojo humano, incluye el volumen del eyaculado, aspecto, color, en algunos casos se mide también el pH y la viscosidad de la muestra.





Volumen: para su medición se utilizan recipientes graduados, en los cuales es depositado el semen desde el momento de su extracción, y dependiendo de la especie será el tamaño del recipiente, dado que en la mayoría es conocido el volumen aproximado de cada eyaculación, por lo que los recipientes van desde mamilas o biberones de 250 ml, como en el caso del equino, o tubos cónicos graduados de 15 a 50ml para los ovinos y bovinos, respectivamente, hasta tubos cónicos de 2ml para especies pequeñas. Existen diferentes tubos graduados como se muestra en la figura 1.



Figura 1. Tubos graduados. Se muestran tubos graduados que pueden ser empleados para la colección de semen, la imagen muestra tubos de 2 ml, 15 ml y 50 ml.

Aspecto: se observa si la mezcla seminal es homogénea o si contiene agregados que forman grumos, lo último sería indicativo de aglutinación espermática o posible contaminación de la muestra, ya sea con células inflamatorias o que el recipiente colector estuviera sucio.

Color: normalmente se espera que sea dentro del tono del blanco, entre más concentrada está una muestra seminal el color se observa más opaco, acercándose a colores cremosos (amarillo paja o beige), mientras que por el contrario, entre más claro se observe un eyaculado es indicativo de una pobre concentración espermática. El observar colores atípicos como el rojo o rosáceo es indicativo de que existe contaminación con células sanguíneas, probablemente debidas a alguna lesión en el tracto reproductor del macho. Mientras que colores amarillentos o verdosos son indicativos de algún tipo de infección bacteriana a lo largo del tracto genital. El color amarillento claro, que además dé la impresión de que el eyaculado está diluido, es indicativo de contaminación por orina.

pH: Cuando se sospecha de que exista algún problema de tipo infeccioso, el cual está afectando la calidad seminal, se realiza la medición del pH de la muestra, para lo cual se





utilizan tiras reactivas en las que se coloca una gota de semen y se observa el cambio de color de la tira, ver figura 2.



Figura 2. Evaluación del pH de una muestra seminal. En la imagen se observa la tira reactiva que ha sido humedecida con la muestra seminal y se está comparando el color para ubicar el rango del pH en el que se encuentra.

Viscosidad: en algunas especies se observa la viscosidad al colocar un poco de la muestra seminal entre los dedos índice y pulgar, lo cual indicaría la cantidad de componentes seminales contenidos en el eyaculado. Existen también aparatos diseñados para medir la viscosidad, sin embargo no siempre se cuenta con ellos, ni es una práctica rutinaria en todas las especies.

Evaluación Microscópica

La evaluación microscópica incluye la valoración de la motilidad. Las pruebas de motilidad evalúan dos parámetros, el movimiento en masa y el movimiento individual o progresivo de los espermatozoides. Mediante el empleo de colorantes supravitales se evalúa la viabilidad espermática, mientras que la concentración y morfo-anomalías de determinan mediante una cámara de Neubauer. Existen muchas otras formas de realizar las evaluaciones microscópicas, sin embargo, depende de la infraestructura y el equipo del que se disponga para utilizar una u otra, la ventaja que presentan las más sofisticadas, que se realizan mediante equipo especializado y adaptado a un software, es que ahorran tiempo y la





valoración es mucho más objetiva. Sin embargo, las evaluaciones más comunes se realizan con un microscopio óptico, tinciones sobre laminillas y la ayuda de la cámara de Neubauer.

Durante la evaluación microscópica es muy importante mantener atemperados todos los materiales que entraran en contacto con el semen, para evitar que al hacer contacto con la muestra se provoque un choque térmico.

Motilidad: Con la ayuda de una pipeta Pasteur, se introduce la punta en el recipiente de la muestra seminal y por capilaridad sube un poco de semen a la pipeta, de inmediato se colocan dos gotas separadas del semen sobre el porta objetos y se coloca el cubre objetos sobre una de ellas. Rápidamente deberá colocarse el portaobjetos atemperado bajo el microscopio para realizar la observación de ambas gotas utilizando el objetivo de 4 y posteriormente se pasa al aumento de 10X. Dependiendo de cada especie se observa el tipo de movimiento masal del eyaculado, generalmente con el objetivo de menor resolución. Enseguida se observa la muestra bajo el cubreobjetos para determinar el tipo de movimiento espermático de forma individual, es decir, si tienen un movimiento progresivo o hacia delante, en línea recta o si solo es vibratorio y no les permite un desplazamiento frontal, o bien, si el tipo de movimiento es giratorio.

Existen parámetros determinados para cada especie, por lo que se debe calificar a cada muestra seminal dentro de la escala preestablecida de acuerdo a lo que se haya observado en la muestra.

Viabilidad: con ayuda de una micropipeta se toman de 10 microlitros de la muestra seminal y se deposita la gota sobre un portaobjetos, previamente etiquetado para identificar la muestra, enseguida se coloca una gota del colorante vital (Eosina-Nigrosina) sobre la muestra espermática y se mezclan con ayuda de un cubreobjetos. Después se hace un frotis y se permite que seque la laminilla expuesta al aire para observarla posteriormente una vez que haya secado. Finalmente, se coloca la laminilla en el microscopio y se analizan las células clasificándolas como vivas o muertas dependiendo si se observan teñidas o no, siendo las últimas las que se consideran vivas o con la membrana plasmática intacta, ver figura 3. Es recomendable contar 200 células en 10 campos distintos, para luego obtener el porcentaje de viabilidad espermática.





Figura 3. Espermatozoides vivos y muertos. Se muestra una microfotografía de espermatozoides teñidos con tinción vital Eosina-Nigrosina. El espermatozoide marcado con la flecha se observa transparente, por lo que se clasifica como vivo, el resto tiene algún grado de coloración rosa, por lo que se clasifican como muertos.

Concentración: se coloca una cantidad conocida de la muestra espermática en un tubo y se diluye con la solución salina formolada, de modo que se conoce el factor de dilución, luego de unos 5 a 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se toman alrededor de 50 microlitros de la mezcla con la micropipeta y se llenan ambas cámaras del contador de células o cámara de Neubauer, ver figura 4.

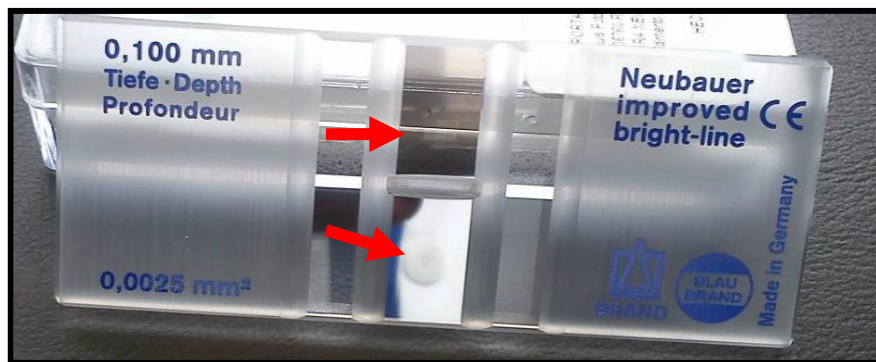


Figura 4. Cámara de Neubauer. Se muestra una fotografía de una cámara de Neubauer, en donde se observa la superficie central brillante, que está dividida en dos cámaras, una superior y una inferior, señaladas por las flechas, cada cámara contiene una cuadrícula que permite realizar el conteo celular.

La observación de la cámara se hace en el microscopio óptico, se inicia enfocando la muestra con el objetivo de 10X, lo cual permite ver la cuadrícula completa de la cámara, ver figura 5.



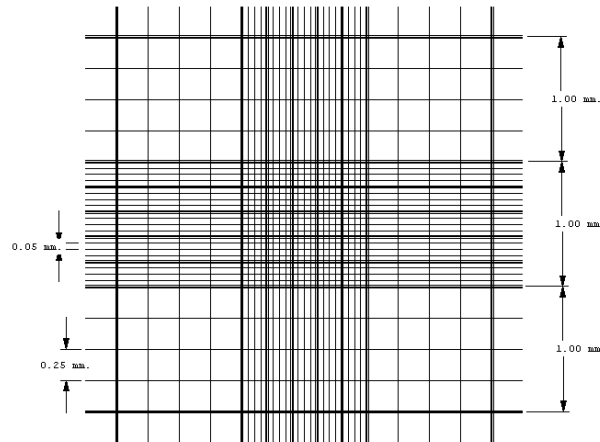


Figura 5. Cuadrícula de la cámara de Neubauer. Se observa el esquema de las líneas horizontales y verticales que forman las cuadrículas centrales, de modo que marca 5 cuadros grandes horizontales y 5 verticales, obsérvese que están formados por líneas más gruesas y dobles, conteniendo cada uno de ellos, 16 cuadros pequeños.

Después de enfocar la cuadrícula completa que forma la cámara, se incrementa el enfoque del microscopio utilizando el objetivo de 40X, se realiza el conteo de los espermatozoides que se encuentren en 5 de los cuadros de cada una de las cámaras, ver figura 6.

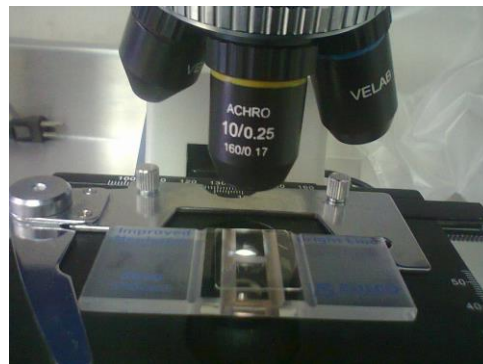


Figura 6. Cámara de Neubauer sobre el microscopio óptico. Se coloca la cámara sobre la platina y se fija, se inicia el enfoque con el objetivo de 10X, para luego pasar al de mayor aumento.

Para determinar la concentración espermática se cuentan las cabezas espermáticas que se localizan en 5 cuadros de la cámara de Neubauer, ver figura 7.



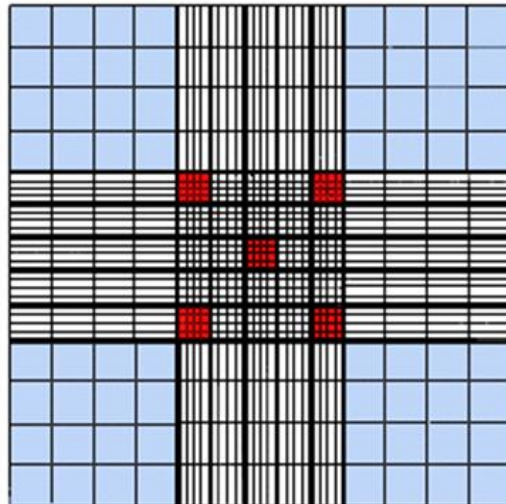


Figura 7. Esquema de la cámara de Neubauer. Se muestra la cuadrícula de la cámara, marcando en color rojo los 5 cuadros en los que se recomienda realizar el conteo de los espermatozoides.

Se obtiene el número de espermatozoides contados en los 5 cuadrantes de la cámara superior y se suman con los espermatozoides contados en los 5 cuadrantes de la cámara inferior, enseguida se obtiene el número promedio y luego se multiplica por el factor de dilución, la profundidad de cámara, y el número de cuadros contados. El resultado indica el número de espermatozoides que se tiene por mililitro del eyaculado.

Morfoanomalías: utilizando la misma muestra colocada en la cámara de Neubauer se observa la estructura espermática, se cuentan 100 células y se clasifican como normales cuando la cabeza y flagelo son regulares, como anormales los que presentan alguna de las siguientes categorías de morfoanomalías: cabezas muy grandes, cabezas muy pequeñas, doble cabeza, flagelos doblados, flagelos enrollados, flagelos múltiples o sin flagelo, también es común encontrar espermatozoides con presencia de gota citoplasmática proximal o distal, ver figura 8.



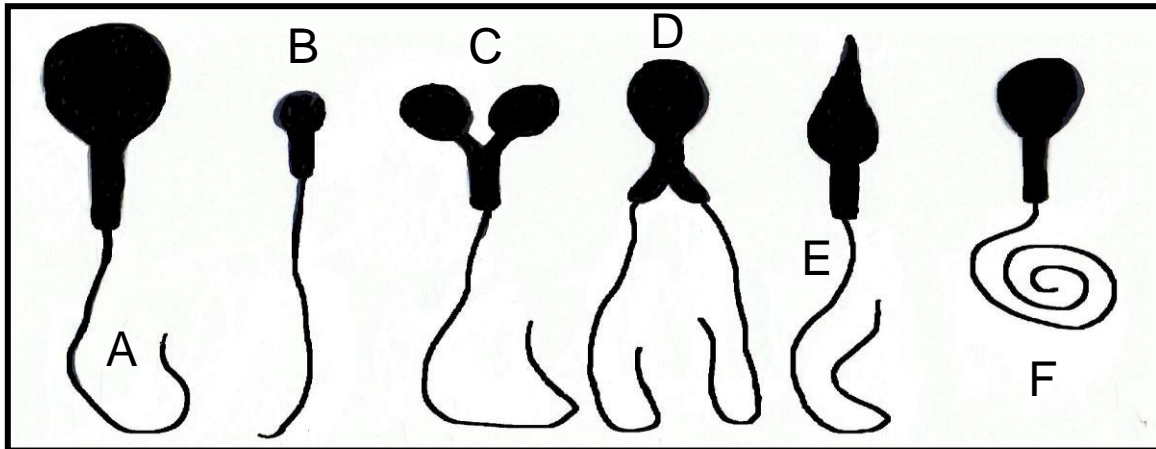


Figura 8. Esquema de morfoanomalías espermáticas. Se muestran algunas de las morfoanomalías más comunes: A, espermatozoide con macrocefalia; B, espermatozoide con microcefalia; C, espermatozoide con doble cabeza; D, espermatozoide con doble flagelo; E, espermatozoide con cabeza en forma de lanza; F, espermatozoide con flagelo enrollado.

1.5 Resultados

Se debe de considerar de manera conjunta las dos evaluaciones seminales, tanto la macroscópica como la microscópica para emitir el diagnóstico definitivo de la calidad de la muestra. En lo referente a las características macroscópicas, al referirnos al volumen se ha observado que cuando se tiene un volumen elevado hay una concentración menor de espermatozoides, por el contrario, en la mayoría de las especies, cuando el eyaculado tiene un volumen pequeño, la concentración espermática es muy elevada. Por otro lado se ha observado que existe una correlación entre el color del eyaculado y la concentración espermática, entre más oscuro es el tono de la muestra, pero dentro del rango de blanco a





cremoso o grisáceo, generalmente el eyaculado contiene una mayor concentración espermática.

En el análisis microscópico, la motilidad masal es un indicador de la viabilidad espermática, sin embargo, no siempre se correlaciona, puesto que es posible tener espermatozoides inmóviles que se encuentren vivos. Mientras que el tipo de movimiento individual se correlaciona con la estructura espermática, entonces los espermatozoides que presentan morfoanomalías tienen movimientos diferentes a los rectilíneos, como son vibratorios o giratorios, incluso puede ser tan grave el daño estructural que presenten que les impida realizar cualquier tipo de movimiento.

1.6 Lectura e Interpretación

Dependiendo de cada especie, se encuentran disponibles algunos parámetros preestablecidos que ayudan a clasificar la calidad seminal, sin embargo hay 3 categorías básicas: buena, regular y mala. Siendo el semen de buena calidad aquel que tiene un volumen aceptable respecto a los estándares, color blanco lechoso a cremoso, pH dentro de los rangos aceptables (cerca de 6.5 y hasta 6.8), viscosidad regular, y con el puntaje mayor referente a la motilidad masal e individual, viabilidad cercana al 80%, concentración dentro de los parámetros altos específicos de cada especie, y con el menor número de morfoanomalías.

Finalmente, si el eyaculado del animal es de buena calidad se podrá recomendar su empleo como semental para realizar montas directas, o bien, si la calidad es excelente se puede recomendar el empleo del su semen para la inseminación artificial en fresco, refrigerado o incluso para el procesamiento de congelación.

Mientras que si la calidad del eyaculado es regular, no se recomendaría su utilización para la inseminación artificial, restringiendo su empleo únicamente a la reproducción por monta natural.

En el caso de que el eyaculado resulte ser de mala calidad, no se recomienda el uso del macho como reproductor, hasta que no se corrijan los parámetros a través de alimentación, manejo, tratamiento médico o cualquier otro que se considere pertinente en pro de mejorar la calidad seminal.

Nota:





Antes de emitir el resultado de la calidad seminal, es recomendable analizar al menos 3 eyaculados por animal. De igual modo, se recomienda realizar evaluaciones seminales a los machos de forma cotidiana, especialmente cuando los parámetros reproductivos se encuentran por debajo de los parámetros esperados.

Preguntas para discusión

1. ¿A qué se refiere el término de choque térmico y cuál es la importancia que tiene durante el manejo del semen para su evaluación?
2. ¿Cuál de las dos evaluaciones, micro o macroscópica, aporta mayor información respecto a la calidad seminal?
3. Menciona el tipo de enfermedades o eventos que podrían afectar la coloración del eyaculado.

PRÁCTICA 2. Evaluación y Obtención de ovocitos

2.1 Introducción

La transferencia embrionaria (TE) es una técnica que está alcanzando una importancia considerable, como herramienta en la reproducción animal ya que permite lograr un mejor aprovechamiento de animales genéticamente superiores, con lo cual nos brinda una serie de ventajas como son: mayor progreso genético, comercialización de embriones a nivel mundial,





etc. Las formas de obtener y producir los embriones empleados en la TE puede ser a través de la “producción *in vivo* o la producción *in vitro*”.

La producción *in vitro* de embriones conlleva una serie de procesos los cuales son secuenciales y el éxito de ésta técnica depende de la correcta realización de todos y cada uno de ellos. El primer proceso para la producción de embriones *in vitro* es la obtención, selección y evaluación de ovocitos, y a pesar de ser un proceso relativamente sencillo y básico, es fundamental llevarlo a cabo correctamente, pues de ello depende el éxito o el fracaso de esta técnica.

La producción *in vitro* de embriones es una técnica a la cual nuestros estudiantes tienen poca accesibilidad debido a la necesidad de personal altamente capacitado y, sobre todo, reactivos y equipo de laboratorio caro y sofisticado. Es por ello que dentro de la unidad de aprendizaje de Reproducción Animal, consideramos necesario proporcionar las bases prácticas para llevar a cabo esta técnica de una forma adecuada.

2.2 Objetivo

Que el alumno realice la obtención, evaluación y selección de ovocitos, para que al finalizar la práctica sea capaz de elegir el método de obtención más apropiado para cada especie, así como evaluar y seleccionar los ovocitos más adecuados para la producción *in vitro* de embriones.

2.3 Materiales a utilizar

- **Material Biológico**

Los ovocitos serán recuperados de ovarios de cerdas sacrificadas en el rastro municipal de la ciudad de Toluca.





- **Material de Laboratorio**

- Pipetas Pasteur
- Sondas de latex
- Boquillas
- Placas de Petri
- Perilla para pipetas
- Tubos de ensaye
- Guantes de látex
- Baño Maria de 35 a 37°C
- Microscopio óptico
- Solución Salina Fisiológica (0.9%)
- Jeringas de 5 ml
- Agujas 22 G
- Hojas de bisturí
- Mechero



2.4 Técnicas a seguir

Técnica





La obtención de ovocitos se puede llevar a cabo de diferentes maneras, sin embargo, en función de la especie con la que se esté trabajando, es más adecuado hacerlo mediante la aspiración o punción de folículos, o mediante el fileteo de la superficie del ovario.

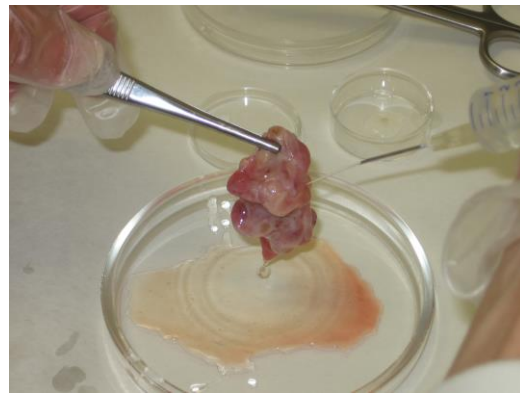
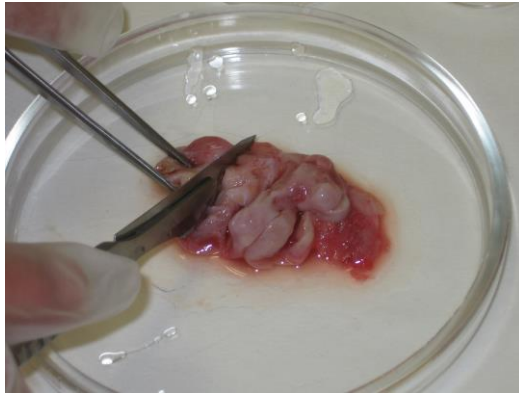
Para llevar a cabo la aspiración folicular se hace uso de la aguja de 22 G acoplada a la jeringa de 5 ml y un poco de solución salina fisiológica a 37°C. Consiste en traspasar la superficie de los folículos mayores de 3 mm, mientras que al mismo tiempo se retrae el embolo de la jeringa para generar un vacío que hará que el ovocito de ese folículo sea extraído y almacenado en la jeringa. Tras repetir esta operación en varios folículos, el contenido de la jeringa se deposita en un tubo de ensaye para que los ovocitos sedimenten en el fondo del tubo y sea más fácil recuperarlos posteriormente.



La punción folicular consiste en colocar el ovario en una placa de petri grande y hacer explotar los folículos de la superficie del ovario mediante un pequeño pinchazo realizado con la punta del bisturí, tras puncionar varios folículos se procede a lavar a presión la superficie del ovario, para ello se hace uso de la jeringa, aguja y solución salina fisiológica a 37°C. Una vez realizado el lavado del ovario se revisa el líquido contenido en la placa de petri, ya que es ahí donde encontraremos los ovocitos.

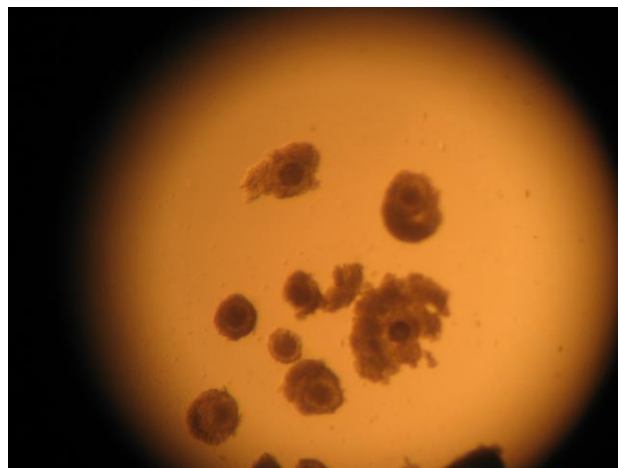
Al igual que en la punción folicular, para realizar el fileteo del ovario, éste se coloca en una placa de petri y con la ayuda del bisturí se le realizan cortes no muy profundos en la superficie. Posteriormente se lava a presión el ovario con solución salina fisiológica a 37°C, y se revisa el líquido que se acumula en la placa de petri.





Selección de ovocitos.

La selección y manipulación de ovocitos se realiza con una pipeta Pasteur a la cual se le ha reducido el diámetro de la punta tras reblandecerla con calor y estirarla hasta alcanzar el diámetro deseado. Una vez que se tienen el diámetro adecuado en la pipeta Pasteur, ésta se acopla a la sonda de latex la cual está provista de una boquilla que nos servirá para sujetar con la boca ese extremo de la sonda y así poder aspirar o soplar a través de ella para capturar o expulsar los ovocitos de la punta de la pipeta. De esta forma podremos manipular los ovocitos para cambiarlos de contenedor, eliminar las células del cúmulus, lavarlos, etc.



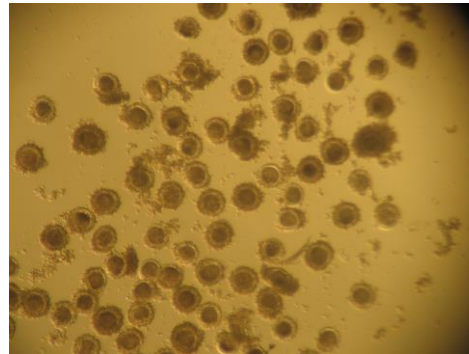
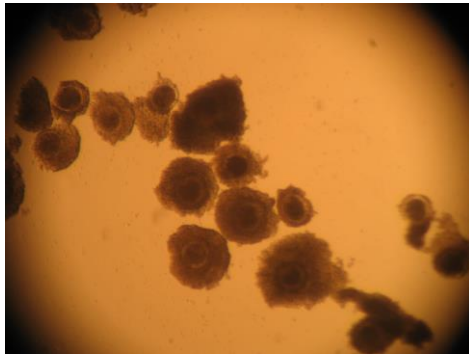
Evaluación de ovocitos.

La evaluación de ovocitos se lleva a cabo en el microscopio estereoscópico, es relativamente sencilla y de forma práctica está basada en que cumplan con tres características principalmente:





- Más de tres capas compactas y continuas de células del cúmulus.
- Citoplasma homogéneo.
- Mayor tamaño.



2.5 Resultados

La primer evaluación (subjetiva) sobre la calidad de un ovocito que será utilizado en la producción *in vitro* de embriones está en función del tamaño del folículo del cual se extrae. Posteriormente, la evaluación de esa calidad, se basa en las características propias de la estructura y apariencia del ovocito, por lo tanto, es muy importante tomar en cuenta que en la extracción y selección de ovocitos debe regir la calidad y no la cantidad, si lo que realmente se pretende es obtener resultados satisfactorios.

2.6 Lectura e interpretación

Dependiendo de cada especie, es recomendable utilizar el método de extracción de ovocitos más adecuado en función de la cantidad de folículos presentes en la superficie del ovario.

La extracción de ovocitos es un proceso tedioso, pero que hay que realizar de una forma muy meticulosa, pues de ello depende el contar con ovocitos de buena calidad, los cuales tendrán mayor competencia al desarrollo que aquellos que no cumplen con los tres criterios básicos que tras la evaluación determinan que se cuenta con un ovocito de calidad.





La habilidad del operario para manipular los ovocitos es determinante, pues el tiempo que permanecen estos ovocitos fuera de las condiciones óptimas para su desarrollo, afecta negativamente su supervivencia.

La utilización de ovarios de hembras sacrificadas en el rastro es una fuente abundante y muy económica de material biológico para la capacitación y entrenamiento de personal en este tipo de tecnologías. Sin embargo, hay que tomar las precauciones necesarias ya que también presentan una serie de inconvenientes como el desconocer por completo el origen y las condiciones de los animales de procedencia.

Preguntas para discusión.

1. ¿Cuál es el método de extracción de ovocitos más adecuado para los ovarios de cerda?, ¿Por qué?.
2. ¿Por qué es importante cumplir estrictamente con las características básicas que deben tener los ovocitos óptimos para la producción *in vitro* de embriones?.
3. ¿Cuál es la importancia de las células del cúmulus en la maduración *in vitro* de ovocitos?.
4. Mencione las ventajas y desventajas de utilizar ovarios de hembras sacrificadas en el rastro, en la producción *in vitro* de embriones.





III SECCIÓN B. ANEXOS

Preparación de reactivos

Solución Salina Fisiológica

Cloruro de Sodio 9.0 g
Agua Destilada c.b.p. 1.0 Litro

Solución para conteo espermático

Se prepara una solución salina fisiológica añadiendo formol a una concentración final del 0.1%.

Cloruro de Sodio 9.0 g
Formol 0.1 ml
Agua Destilada c.b.p. 1.0 Litro

Se pesa el Cloruro de Sodio y se agrega a 500 ml de agua destilada, la cual debe almacenarse en un recipiente de vidrio, se homogeniza la mezcla y enseguida se agrega el volumen de formol indicado, nuevamente se mezcla y se reconstituye hasta un litro con agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente en recipiente de vidrio, tapado.





IV BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía específica Práctica 1

- Cortéz RC, Herrera CC, Gallegos SJ, Salazar OJ. Manual sobre fisiología de la reproducción, inseminación artificial y ultrasonografía en ovinos. Fundación Grupo Produce & Colegio de Postgraduados. México D.F., México. 2011.
- Herrick JB & Self HL. Evaluación de la fertilidad del toro y del verraco. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1965. pp 67-96.
- Holt C., Holt W.V, Moore H. D., Reed H. C., Curnock R. M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. J. Androl. 1997; 18(3): 312-323.
- Rodríguez PV. Inseminación Artificial. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. 1974. pp 84-116.
- Silva P. F. N. and Gadella B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. Theriogenology. 2006; 65: 958-978.
- Watson P. F. Recent developments and concepts in the criopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod. Fertil. Dev. 1995; 7: 871-891
- Yazmín Elizabeth Felipe-Pérez, María de Lourdes Juárez-Mosqueda, Enrique Othón Hernández-González, Javier de Jesus Valencia. "Viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques" and "Viabilidade de espermatozoides bovinos frescos e criopreservados comparados por duas técnicas de coloração". Acta Veterinaria Brasilica. 2008; 2(4).





Bibliografía específica Práctica 2

- Arav, A. (2001) Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology*, 55, 1561-1565.
- Cano, T.R., Gil, H. L., González, O. N., Martínez, A. F., Malo, L. C., Pinto M. D. (2011). Fecundación *in vitro* y sus efectos sobre la tasa de división y desarrollo embrionario en ovocitos de cordera con y sin células del cúmulus: Estudio comparativo del uso de la Albúmina Sérica Bovina y el Suero de Oveja en los medios de capacitación. *Revista Científica, FCV-LUZ*. Vol. XXI, N° 2, 145-151.
- Fatehi, A. N., Zeinstra, E. C., Kooij, R. V., Colenbrander, B. and Bevers, M. M. (2002). Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate. *Theriogenology*, 57, 1347-1355.
- Han, Z. B., Lan, G. C., Wu, Y. G., Han, D., Feng, W. G., Wang, J. Z. and Tan, J. H. (2006) Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulusoocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction*, 132, 749-758.
- Marchal, R., Vigneron, C., Perreau, C., Bali-Papp, A. and Mermillod, P. (2002). Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*, 57, 1523-1532.
- Nagai, T. (2001) The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55, 1291-1301.
- Pawshe, C. H., Totey, S. M. and Jain, S. K. (1994) A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*, 42, 117-125.
- Shirazi, A. and Moalemian, Z. (2007). Ovine cumulus cells estradiol-17 Beta production in the presence or absence of oocyte. *Anim Reprod Sci*, 101, 125-133.





V. ACTUALIZACIÓN

Manual de Prácticas de Laboratorio de Reproducción Aplicada. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas, México a 10 de Abril de 2013.

Primera Edición.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTEENIA

Director:

Dr. en C. José Mauro Victoria Mora

Departamento de Infraestructura Académica:

M. en C. Lemuel León Lara

Coord. Comunicación y Calidad:

Elder Higuera Vázquez

Elaboró:

Dra. en C. Yazmín Elizabeth Felipe Pérez

Dr. en C. Rafael Cano Torres

Revisó:

