

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL

LABORATORIO MANEJO DE LA REPRODUCCIÓN

Anexo 3

MANUAL DE PRÁCTICAS Y SESIONES EXPERIMENTALES

Octubre 2025

I.- OBTENCIÓN DE SEMEN

OVINOS
PERROS
CONEJOS

El mejor procedimiento para la colecta del semen (Ovino y Conejo), es el uso de vagina artificial, la unidad proporciona temperatura, presión y lubricación adecuada para provocar la eyaculación, y se conecta a un tubo calibrado para depositar el semen.

Características de vaginales artificiales en animales domésticos.

Especie	Material	Dimensiones (cm)		Temperatura ° C
		Largo	Diámetro	
Bovinos	Cilindro rígido	30.0-41.0	7.0-8.0	40.0-45.0
Ovinos	Cilindro rígido	10.0-15.0	5.0-7.0	38.0-44.0
Caprinos	Cilindro rígido	15.0-21.0	3.5-6.0	40.0-47.0
Equinos	Cilindro rígido	45.0	15.0-18.0	40.0-50.0
Conejos	Cilindro rígido			

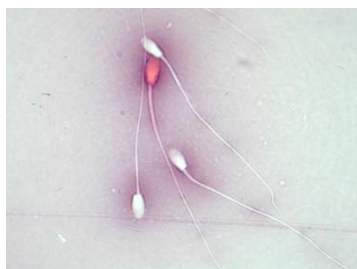
Otra manera para obtener el semen es por medio de la electroeyaculación, en el siguiente cuadro se muestran los voltajes y tiempos por especie.

ESPECIE	VOLTS	TIEMPOS
Bovinos	2-12	4-6
Ovinos	2-3	2-8
Caprino	2-8	5-8

La técnica de la mano enguantada es la más usada para obtener semen en perros, la técnica consiste en aplicar un masaje suave con la mano enguantada sobre el prepucio hasta que el bulbo peneano empieza a aumentar de tamaño, aplicando estímulos púlsatiles alrededor y por detrás del bulbo, el macho empezara a excitarse por lo cual se coloca el vaso colector para obtener la muestra.

II.- EVALUACIÓN DE SEMEN

BOVINOS
OVINOS
CAPRINOS
PORCINOS
EQUINO
PERROS
GATOS



Este análisis tiene que tomar en cuenta las características macroscópicas (volumen y color) y microscópicas (concentración, motilidad en masa y progresiva, % de espermatozoides vivos y % de morfología) del eyaculado. Estas dos evaluaciones son complementarias para tener una idea de la calidad del eyaculado.

Para la determinación de las características macroscópicas se tomara en cuenta el color del eyaculado, siendo este de color blanquecino en el bovino, equino, caprino, ovino, canino y felinos, además la cantidad del eyaculado obtenido que será reportado en mililitros.

Una vez realizada la evaluación macroscópica se diluye la muestra de semen para la evaluación de las características microscópicas que es llevada a cabo en el laboratorio con la ayuda de microscopios, termo platina, pipetas Pasteur, Pipetas de Thomas, tubos cónicos, cámara de Neubauer, portaobjetos, cubreobjetos, tinción de eosina – nigrosina y gradillas.

Para determinar cada característica se emplean diferentes técnicas como son:

1.- EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD MASAL Y PROGRESIVA

MATERIAL

- Microscopio campo claro
- Platina
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pipeta Pasteur

PROCEDIMIENTO

Para determinar la motilidad masal es necesario depositar una gota de semen con la pipeta Pasteur en un portaobjeto que este en la platina a 37.5° C y se observa en el microscopio con el objetivo de 10x, es recomendable observar las orillas de la gota de semen para evaluar la cantidad de remolinos que se forman, a mayor cantidad de remolinos se le dará un valor de 1, a menor cantidad de remolinos se le dará un valor de 5, es decir los valores que se pueden dar a esta evaluación son de 1 a 5.

Para evaluar la motilidad progresiva se deposita una gota de semen diluido con la pipeta Pasteur en un portaobjetos que esta en la platina a 37.5° C junto con un cubreobjetos y se observa con un microscopio con el objetivo 10x, en esta evaluación se tomará en cuenta sólo los espermatozoides que presentan movimiento rectilíneo y desaparecen del campo de visión, entre más espermatozoides que tengan este movimiento se acercarán a un valor de 100% y entre menos presentan este movimiento o que tengan movimiento pero en un mismo lugar se a cercarán a un valor de 0%, es decir el rango para calificar este tipo de movimiento será de 0% a 100%.

2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

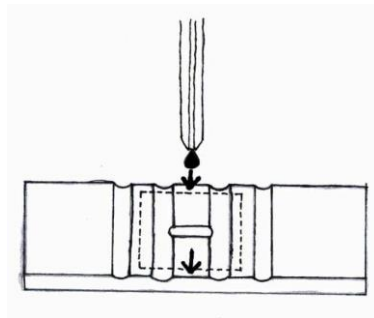
MATERIAL

- Cámara de Neubauer
- Pipeta de Thomas
- Succionador

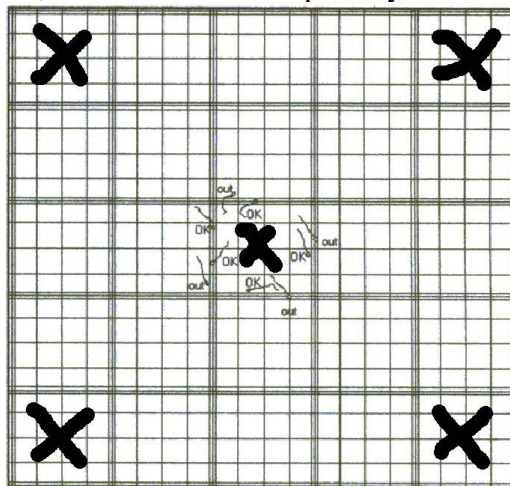
- Papel
- Cloruro de sodio al 4%

PROCEDIMIENTO

- A) Se succiona semen hasta la marca de 0.5 de la pipeta de Thomas.
- B) Después se succiona cloruro de sodio hasta la marca 101 (1:200) de la pipeta de Thomas.
- C) Con los dedos se tapa la boquilla de la pipeta de Thomas y se agita para que el agitador que esta en la pipeta de Thomas mezcle el semen con el cloruro de sodio.
- D) Se desechan las primeras 5 gotas en el papel.
- E) La sexta gota se deposita en la cámara.



- F) Con un microscopio de campo claro se enfocará con el objetivo de 10X, una vez encontrada la cuadrícula de la cámara se enfoca a 40X y se empieza a contar.
- G) Se contarán cinco cuadros, los cuatro de las esquinas y el del centro.



NOTA: se deberá de elegir las líneas a contar que serán la “superior izquierda o la “inferior derecha” para un conteo homogéneo en todos los cuadros a contar.

- I) Cuando se tenga el conteo de las dos cuadrículas, se calculará un promedio y el resultado se multiplicara por 10^7 para obtener el número de espermatozoides por mililitro.

Por citar un ejemplo, se contaron en la cámara 125 espermatozoides en promedio, esta cantidad se multiplica por 10^7 y nos da como resultado 1250×10^6 espermatozoides/ml.

3.- PORCENTAJE DE VIABILIDAD Y MORFOLOGÍA

MATERIAL

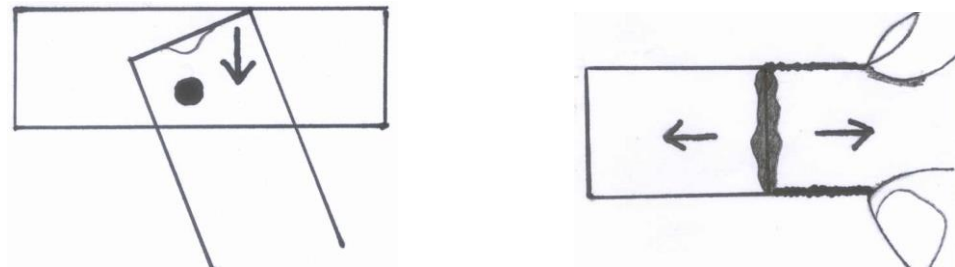
- Portaobjetos
- Tinción de Eosina-Nigrosina
- Microscopio de campo claro
- Aceite de inmersión
- Contador

PROCEDIMIENTO

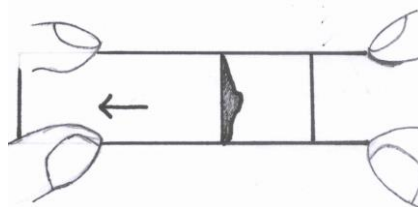
- Limpiar los portaobjetos a utilizar.
- Poner una gota de semen en el portaobjetos y una gota de tinción de Eosina-Nigrosina, tratando de que esta ultima sea de la misma cantidad a la gota de semen.



- Con el lado más corto de otro portaobjeto se jala la gota de semen hacia la gota de tinción y se mezclan con mucho cuidado evitando hacer un mezclado rápido e intenso.



- En un tercer portaobjetos se hace el frotis, extendiendo la mezcla de semen – tinción de derecha a izquierda y nunca se debe hacer un frotis de forma contraria es decir, de izquierda a derecha.

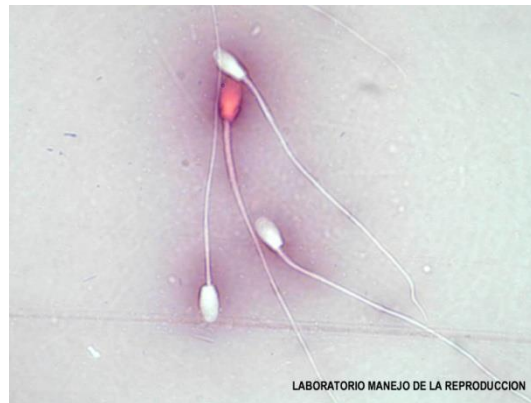


- Se fija el frotis con calor de tal manera que se seque lo más rápido posible.
- Con un microscopio de campo claro se enfocará con el objetivo de 10X, después con el de 40X aumentando un poco la intensidad de luz, hasta el final se enfoca con el de 100X,

para ver con este objetivo se utiliza una gota de aceite de inmersión en nuestra muestra y después se observa.

G) Con la ayuda de un contador se registra las células tomando en cuenta el siguiente criterio:

Espermatozoide vivo	Si la cabeza del espermatozoide esta blanca y sin colorear.
Espermatozoide muerto	Si la cabeza del espermatozoide esta teñida o coloreada.



H) Para la morfología del espermatozoide se observan 100 células con el objetivo de 100X, contando los espermatozoides normales y anormales según la clasificación de anormalidades primarias y secundarias.

III.- PREPARACIÓN DE DILUYENTES DE CONGELACIÓN Y CONGELACIÓN DE SEMEN EN DIFERENTES ESPECIES DOMÉSTICAS

BOVINO
OVINO
CAPRINO
PORCINO
EQUINO
PERRO
AVES

La dilución del semen permite almacenar al espermatozoide proporcionándole nutrientes para su mantenimiento *in vitro*, además se puede obtener un mayor número de dosis por eyaculado para la inseminación artificial.

1.- Diluyentes De Congelación En Las Diferentes Especies Domesticas

La dilución del semen permite almacenar al espermatozoide proporcionándole nutrientes para su mantenimiento *in vitro*, además se puede obtener un mayor número de dosis para la inseminación artificial por eyaculado. Existen numerosos diluyentes para la dilución de semen de bovino, equino, caprino, ovino, cerdo, canino, gato y aves, de los cuales sólo se mencionan algunos de ellos.

BOVINOS

Diluyente TRIS-yema de huevo para congelar semen de bovino (Ahmand and Foote, 1985; Chen, *et al.*, 1993)

Componente	Cantidad
Tris	3.028 g
Acido cítrico monohidratado	1.7 g
Glucosa	1.25 g
Glicerol	8.75 ml
Agua bidestilada estéril	100ml
De lo anterior se toma	80.00 ml
Yema de huevo	20.00 ml

EQUINO

Para el semen de equino y cerdo se centrifuga el eyaculado, ya que por los altos volúmenes que se obtienen de los eyaculados en estas dos especies, es difícil trabajar el semen para su posterior almacenamiento. Por esta razón existen medios de centrifugación para semen de equino que son los mismos diluyentes que se usan para la congelación, pero estos no contienen glicerol o el crioprotector a utilizar, en el equino la centrifugación es de 400 a 1000 gravedades durante 5 a 12 minutos dependiendo el diámetro de la centrifuga.

Composición del medio de centrifugación para preparar el medio de congelación citrato-EDTA(*Sal disódica del (ácido etilendinitrilo)(tetracético)*) y Glucosa-EDTA para semen de Equino.

Componente	Citrato-EDTA	Glucosa-EDTA
Glucosa	1.500 g	59.985 g
Citrato de Sodio deshidratado	25.950 g	3.700 g
EDTA disódico	3.699 g	3.699 g
Bicarbonato de sodio	1.200 g	1.200 g
Penicilina	-	10 ⁶ UI
PH	6.89	6.59
MOsm/Kg	290	409

Amann and Pickett, 1987; Angus, 1993; Cochran et al., 1984; Heitland, et al., 1996; Jimenez, 1987.

Composición del diluyente para congelación Lactosa-EDTA-Yema de huevo para semen de equino.

Componentes	Cantidad ml
Solución lactosa (11% p/v)	50
Solución Glucosa-EDTA	25
Yema de Huevo	20
Glicerol	5
Equex STM	0.5

Amann and Pickett, 1987; Angus, 1993; Cochran et al., 1984; Heitland, et al., 1996; Jimenez, 1987.

CERDO

Una vez obtenido el semen se coloca en tubos cónicos para centrifugar a 1500 r.p.m. por 10 minutos y el sobrenadante es retirado solo para obtener el paquete espermático. Este paquete se diluye en el siguiente diluyente:

Composición	Cantidad
Tris	200mM
Ácido cítrico	70.8 mM
Glucosa	55.51 mM
Yema de huevo	25%
Gentamicina	0.2 ml
Glicerol	5 %
Agua bidestilada	20 ml

CAPRINO

Para congelación de semen de caprino se preparó una solución madre colocando 32.71 grs de Tris (hidroximetil amino-metano), 18.30 grs de Acido Cítrico, 13.50 grs de Frutuosa, 100,000 U.I. de penicilina y 10mg de Estreptomocina y aforando a 1000 ml. con agua bidestilada. Una vez homogenizada la solución se distribuyó en matraces de vidrio con capacidad de 50 ml cada uno. Se agregó 35 ml de la solución madre en cada matraz y ésta se conservó en congelación, conforme se utilizó se fue descongelando a temperatura de 37° C, un matraz por día de trabajo. Una vez descongelada se preparó el diluyente agregando a la solución madre 3.5 ml de glicerol, 1.5 ml de agua bidestilada y 10 ml de yema de huevo (10 %) aforando a 50 ml.

CANINOS

Se prepara una solución madre con 2.9 gr de Tris (Hidroximetilamino-metano), 1.32 gr de Ácido Cítrico, 1.25 gr de fructuosa, 100,000 U.I. de penicilina y 100 mg de estreptomocina, aforándose a 100 ml de agua bidestilada (Esquivel y Páramo, 1990). Una vez homogeneizada la solución, se distribuye en un matraz de vidrio con una capacidad de 50 ml cada uno, se agregan 10 ml de solución madre en cada matraz y ésta se conserva en congelación, conforme se utiliza dicha solución se va descongelando a temperatura de 37° C, en baño Maria, agregando 1 ml de glicerol y 2 ml de yema de huevo. Una vez preparado el diluyente a una concentración de 10% de glicerol y 20% de yema de huevo, éste se colocó en baño Maria a 37° C para trabajarlo.

2.- MÉTODOS DE CONGELACIÓN

BOVINO

Una vez obtenidas las muestras que se van a congelar se introducen al cuarto frío en una mamila con agua que esta a la misma temperatura, transcurrida las dos horas se agrega el diluyente con glicerol para que después se deje 2 horas de periodo de equilibrio. De cada muestra seleccionada se toman 4 dosis las cuales son envasadas en pajillas de 0.25 ml convenientemente identificadas, selladas con alcohol de polivinilo y son colocadas verticalmente en la canastilla que se introduce en el tanque criogénico (M.V.E. SC/15 de 14 Kg), a 10 cm sobre el nivel de N₂ líquido durante 10 minutos, transcurrido el tiempo, las dosis se sumergen en el N₂, conservándose a -196° C, hasta su descongelación.

EQUINO

Una vez diluido el eyaculado se introducen al cuarto frío después de 2 hrs. para bajar la temperatura a 5° C. Después de haber agregado el diluyente con glicerol, las muestras fueron colocadas en pajillas de clorhidrato de polivinilo de 0.5 ml fueron identificadas y selladas con alcohol de polivinilo, dándoles un tiempo de equilibrio de 2 horas a 4° C para su posterior envasado, cada pajilla tiene una concentraciones de 100×10^6 , (vol obtenido X concentración espermática X motilidad progresiva X espermatozoides vivos X espermatozoides normales = # de espermatozoides viables para congelación / concentración espermática (100×10^6) = # de dosis por muestra), fueron colocadas de forma perpendicular en gradillas que se introdujeron en un tanque criogénico a 10 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido por 10 minutos. Transcurrido este tiempo las dosis fueron sumergidas conservándose a -196° C durante 15 días.

CERDO

El semen fue puesto en tubos cónicos con una concentración final aproximada a 200 millones de espermatozoides por mililitro. Dichos tubos fueron centrifugados a 1500 r.p.m. por 10 minutos y el sobrenadante retirado para obtener sólo el paquete espermático. Este paquete espermático fue diluido con el diluyente A (200 mM Tris, 70.8 mM ácido cítrico, 55.51 mM de glucosa, 25% de yema de huevo y 0.2 ml de Gentamicina todo esto en 20 ml de agua bidestilada) y puesto en matraces a temperatura ambiente. Dichos matraces fueron puestos a su vez, en vasos de precipitado con agua corriente e introducidos al cuarto frío durante 90 minutos para un periodo de refrigeración de los espermatozoides. Cuando el semen diluido alcanzó una temperatura de 5° C se adicionó el diluyente B, el cual contenía los mismos componentes que el diluyente A, más 10% de glicerol, para obtener una concentración final de 5% de glicerol, esta adición se realizó en dos pasos a intervalos de 10 minutos. Posteriormente el semen diluido se mantuvo a 5° C en un tiempo de equilibrio de 3 horas. Transcurrido el tiempo de equilibrio el semen fue envasado en pajillas de 0.5 ml (pajilla francesa) y selladas con alcohol polivinilo. La congelación se realizó en dos fases, primero por la exposición de las pajillas a vapores de nitrógeno a una distancia de 10 cm del nivel de nitrógeno líquido y después son sumergidas al mismo.

CAPRINO

Una vez diluido y evaluado el eyaculado se introducen al cuarto frío después de 1 ½ hrs para bajar la temperatura a 5° C se agrega el diluyente con glicerol cada 10 minutos dividido en dos fracciones y se maneja con un periodo de equilibrio de 2 hrs. Una hora antes de terminar el periodo de equilibrio se empajilla, colocando una pajilla en la boquilla de la jeringa y se succiona de tal manera que el semen quede a un centímetro antes de tocar el algodón, sin seguir succionando más semen diluido, se moja el algodón de la pajilla, y por último se hace el sellado con el alcohol de polivinil. Se empezó a congelar bajando la muestra a 10 cm arriba del nivel del nitrógeno por 15 minutos para recibir los vapores N₂ después se sumergen al N₂.

CANINO

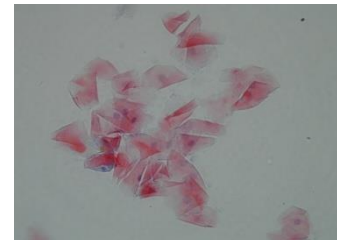
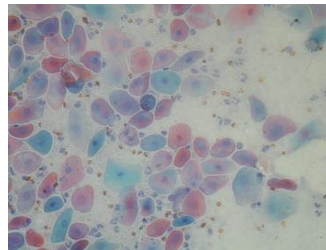
Se preparó una Solución Madre con 2.9 gr de Tris (Hidroximetilamino-metano), 1.32 gr. de Acido Cítrico, 1.25 gr. de Fructosa, 100.000 U.I de Penicilina y 100 mg de estreptomocina, aforándose a 100 ml de agua destilada. Una vez homogeneizada la solución, se distribuye en matraces de vidrio con capacidad de 50 ml cada uno, se agrega 10 ml de solución madre en cada matraz y ésta se conserva en congelación, conforme se utiliza dicha solución se va

descongelando a temperatura de 37° C, en baño María, agregando 1 ml de glicerol y 2 ml de yema de huevo. Estando preparado el diluyente a una concentración de 10% de glicerol y 20% de yema de huevo, éste se coloca en baño María a 37° C. Se lleva a cabo una dilución 1:2. La pajillas de 0.5 ml se llenaron por medio de succión, al llenarse se deja un espacio de aire de aproximadamente un centímetro con el objeto de evitar que el semen rompa el envase, ya que éste se expande cuando se congela.

Las pajillas ya llenas se sellan con alcohol polivinílico equilibrándose a temperatura de 5° C durante 2 hrs., posteriormente a esto, se procedió a pasar las pajillas a vapores de nitrógeno líquido a una altura de 10 cm, del nivel del nitrógeno durante 15 min y por último se sumergieron a -196° C. Al cabo de una semana se descongelaron en baño maría a una temperatura de 55° C por 5 segundos para su posterior evaluación.

IV.- CITOLOGÍA VAGINAL EXFOLIATIVA EN PERRAS Y HÁMSTER

Mediante la técnica de Papanicolau se realiza el diagnóstico del momento adecuado del estro para hacer el cruzamiento o realizar la inseminación artificial en la perra. En el hámster es utilizada para precisar el momento del apareamiento.



PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR UNA CITOLOGÍA VAGINAL EXFOLIATIVA (CVE)

Entre las aplicaciones que se le ha dado a la citología vaginal exfoliativa se encuentran las siguientes: a) Diagnóstico funcional (grado de proliferación del epitelio vaginal, evaluando así la función hormonal para determinar el inicio de la pubertad, fase del ciclo estral y gestación), b) Detección de neoplasias (búsqueda de células tumorales para el descubrimiento precoz de un carcinoma).

La tinción de Papanicolaou se basa en la reacción química de los colorantes con los elementos celulares, su capacitación varía de acuerdo con el pH del medio intracelular. Es tricrómica a base de los colorantes de Hematoxilina (tiñe los núcleos), OG 6 (tiñe los citoplasmas transparentes) y EA 50 (tiñe los citoplasmas más densos).

Técnica:

Pasos de la tinción	Agente	Tiempos
1	Fijación con cito-spray o etanol 96%	15 min
2	Etanol 80%	Baños
3	Etanol 70%	Baños
4	Etanol 50%	Baños

5	Agua corriente	Baños
6	Hematoxilina	5 min
7	Agua corriente	Baños
8	Etanol 50%	Baños
9	Etanol 70%	Baños
10	Etanol 80%	Baños
11	Etanol 96%	Baños
12	Colorante OG-6	10 min
13	Etanol 96%	Baños
14	Colorante EA-50	10 min
15	Etanol 96%	Baños
16	Etanol absoluto	Baños
17	Etanol absoluto	Baños
18	Xilol	Baños
19	Xilol	Baños
20	Montar en resina sintética o Bálsamo de Canadá	

LA CITOLOGÍA VAGINAL EXFOLIATIVA EN LA PERRA DURANTE SU CICLO ESTRAL ES LA SIGUIENTE (Lacroix y Páramo, 1991)

Células	Proestro %	Estro %	Diestro %	Anestro %
Anucleadas	10	90	30	10
Superficiales	30	8	20	10
Intermedias	50	2	20	20
Parabasales	10	0	30	60
Neutrófilos	±	-	+	++
Eritrocitos	++	+	-	-

V.- PUNCIÓN DE OVARIOS Y RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

El alumno deberá presentarse con bata blanca y limpia para realizar la práctica dentro del laboratorio, se registrará en bitácora de entrada (anotando nombre completo, hora de entrada y salida, procedencia o módulo, actividad a realizar) y llenará una papeleta para el préstamo de material.

Material

Al alumno se le proporcionará el siguiente material para realizar la práctica:

- Ovarios
- Medio TAL-Hepes
- 1 Jeringa de 10 ml
- 1 Aguja calibre 18 G
- 1 Tubo cónico de 50 ml
- 1 Caja de Petri grande

- 2 Cajas de Petri pequeñas
- Microscopio estereoscópico
- Boquillas para succión
- Manguera de latex para succionar
- Pipetas Pasteur con punta estirada
- Guantes de latex

Técnica

1. Se toman con la jeringa dos mililitros de medio TAL-Hepes y se comienza a puncionar los ovarios, colocando el bisel de la aguja hacia abajo, se tomarán en cuenta solo los folículos de 3 a 7 mm de diámetro, aspirando la mayor parte del líquido folicular de estos.
2. Una vez que se hayan obtenido aproximadamente 6 ml de medio y líquido folicular se procederá a quitar aguja y se colocará el contenido de la jeringa en el tubo cónico, de nuevo se toman dos mililitros de medio y se continúa con el siguiente ovario.
3. Ya terminados los ovarios se deja sedimentar el medio por 15 minutos, se retira el sobrenadante y se le agregan 15 ml más de medio limpio para lavar los ovocitos, se deja sedimentar 15 minutos más y se quita el sobrenadante, se agrega un poco más de medio y se vierte todo en la caja de Petri grande para poder colectar a los ovocitos.
4. Se coloca la caja de Petri sobre el microscopio estereoscópico y se colectan los ovocitos succionándolos con las pipetas Pasteur con la menor cantidad de medio y se transfieren a una caja para su clasificación.
5. Los ovocitos serán clasificados bajo un aumento de 40X como aptos (categorías I y II) y no aptos (categorías III y IV) para la Maduración *in vitro* (MIV), basándose en las características de las células del *cumulus oophorus*, corona radiada y la homogeneidad del citoplasma.
 - a) Ovocitos categoría I (Excelentes): presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 ó más capas compactas del *cumulus*.
 - b) Ovocitos categoría II (Buenos): presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa, pero menos de 5 capas del *cumulus*.
 - c) Ovocitos categoría III (Regulares): presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del *cumulus* presentes son menos compactas.
 - d) Ovocitos categoría IV (Malos): presentan citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado y las células de la corona y del *cumulus* se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad.

VI.- PROCEDIMIENTO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS

El alumno deberá presentarse con bata blanca y limpia para realizar la práctica dentro del laboratorio, se registrará en bitácora de entrada (anotando nombre

completo, hora de entrada y salida, procedencia o módulo, actividad a realizar) y llenará una papeleta para el préstamo de material, posteriormente se anotará en los equipos a utilizar (campana e incubadora).

Para tener acceso al área estéril el alumno deberá presentarse con las uñas cortas, limpias y sin esmalte, no traer puestos accesorios (pulseras, relojes, anillos), ni maquillaje, el uso de cofia, cabello recogido y cubrebocas es obligatorio.

Material

Al alumno se le proporcionará el siguiente material para realizar la práctica:

- Medio TCM-199
- Aceite mineral estéril
- 2 Cajas de Petri pequeñas
- 1 Caja de 4 pozos
- Microscopio estereoscópico
- Boquillas para succión
- Manguera de latex para succionar
- Pipetas Pasteur con punta estirada
- Guantes de latex
- Hormona Merional

Técnica

1. Una vez seleccionados los mejores ovocitos (categoría I y II) se transfieren a una caja de Petri con medio TCM-199 suplementado (Cisteína y EGF) para su lavado.
2. Se dividen aleatoriamente los ovocitos en la caja de 4 pozos (5 a 20 ovocitos por pozo) preparada con medio TCM-199 cubierto con aceite mineral estéril y se le adiciona la hormona merional.
3. Una vez terminado esto se introduce la caja de 4 pozos a la incubadora para la maduración *in vitro* de los ovocitos, el tiempo de incubación depende de la especie.
4. Pasado el tiempo requerido para su maduración se lavan los ovocitos mediante pipeteo para eliminar las células de la granulosa y se observa la presencia de un primer cuerpo polar, con lo que se determina la maduración de los ovocitos, los cuales ya están listos para su fertilización *in vitro* y posterior desarrollo embrionario *in vitro*.

VII.- DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN POR ULTRASONIDO

VACA
BORREGA
PERRA

El diagnóstico de gestación es de utilidad para establecer las prácticas de manejo adecuadas para el animal gestante o bien para incorporar a los animales no gestantes a su actividad reproductiva.



El SonoVet 2000 es un ultrasonido portátil de alta resolución y penetración profunda que cuenta con amplia variedad de funciones. A continuación se describirá el procedimiento de operación general. Para funciones específicas consulte con el personal de laboratorio.

1.- Conecte el adaptado de corriente a la consola en la entrada que se encuentra en la parte de atrás del aparato.

2.- Conecte el transductor en la entrada correspondiente al lado derecho de la consola.

3.- Conecte el aparato a la corriente eléctrica o utilice las baterías según sea el caso. **NUNCA encienda el aparato sin haber conectado primero el transductor.**

4.- El rango de rotación del monitor es limitado. NO lo gire más de 180°.

5.- Solo utilice el gel apropiado para el transductor. La utilización de cualquier otro producto puede dañarlo.

6.- Cuando haya terminado de usarlo, limpie el transductor con agua y jabón suave. Séquelo con papel absorbente cuidando no rayarlo. Desinfectelo con alcohol al 70%. No sumerja el cable del transductor más allá de la marca de seguridad. No use solventes o limpiadores abrasivos para limpiar ninguno de los componentes del aparato.

7.- Para guardar imágenes anote en la bitácora que se encuentra en el estuche del ultrasonido el número, especie y observaciones correspondientes a la imagen.

8.- Nunca utilice el ultrasonido sin la supervisión del personal del laboratorio.

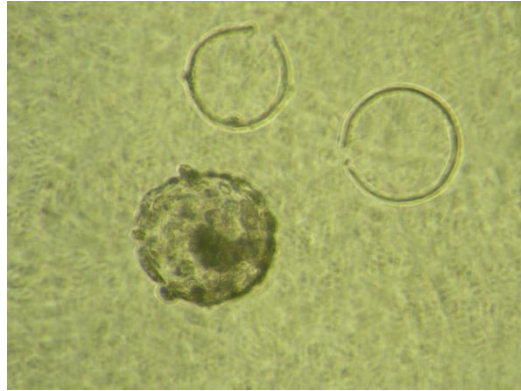
9.- Apague el equipo con el interruptor y sólo entonces desconecte el transductor y guárdelo inmediatamente en el estuche.

IMPORTANTE: Siempre proteja al transductor de golpes, caídas o rayones pasando el cable alrededor de cuello mientras lo está usando.

VIII.- PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- DESARROLLO DE EMBRIONES DE BOVINO A PARTIR DE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS OBTENIDOS MEDIANTE TRATAMIENTO HORMONAL DE OVARIOS *IN VITRO*. (EN PROCESO DE APROBACIÓN)

Esta técnica permite recuperar y tener disponibles gametos de hembras después de terminar su etapa de producción.



- EFECTOS DE LA CONSERVACIÓN DE PIEL REFRIGERADA Y VITRIFICADA A LOS 14 Y 30 DÍAS DE OBTENIDAS LAS MUESTRAS, SOBRE LA OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS COMO FUENTES DE NÚCLEOS PARA LA CLONACIÓN SOMÁTICA.

Se pretende establecer la técnica para tener fuentes de núcleos para la clonación somática.



I.- RECONOCIMIENTO DE LA ANATOMÍA DE ÓRGANOS REPRODUCTORES DE:

BOVINOS
OVINOS
CAPRINOS
PORCINOS
EQUINO
PERROS
GATOS

Mediante la observación de los órganos reproductores de diferentes especies de animales domésticos, se establecen las características de las estructuras anatómicas por especie que permite comprender los procesos fisiológicos que se llevan a cabo en cada una de ellas.



1.- PRÁCTICA DE RECONOCIMIENTO DE ESTRUCTURAS ANATÓMICAS DE LA HEMBRA

MATERIAL

- Pinzas
- Tijeras
- Bisturí
- Guantes
- Regla

PROCEDIMIENTO

- A) Colocar el aparato reproductor de hembra sobre la mesa en posición antero-posterior.
- B) La parte anterior al observador inicia con la vulva, en esta se pueden observar los labios vulvares externos cubiertos de pelo y los internos de su mucosa, en la parte inferior interna se observa el clítoris.
- C) La siguiente estructura anatómica interna que se puede identificar es el vestíbulo, después de este se encuentra la vagina, en su piso está el orificio uretral y la vagina se continua hasta el cérvix, formando un fondo de saco conocido como fornix.
- D) El cérvix es una estructura rígida compuesta principalmente por tejido fibroso y une a la vagina con el útero. Debido a su función siempre se encuentran secreciones mucosas que pueden tener diferentes grados de consistencia.
- E) Las siguientes estructuras anatómicas son el útero y cuernos uterinos, estos tienen la misma característica en los estratos que los conforman, al corte se pueden identificar el perimetrio, miometrio y endometrio. Su longitud y diámetro es mayor conforme incrementa el número de gestaciones.
- F) El oviducto continúa después del cuerno uterino y en él se pueden identificar el infundíbulo, ampolla e istmo.
- G) La fimbria recubre al ovario y se observa como un tejido delgado y transparente, en ella se encuentran una gran cantidad de vasos sanguíneos.
- H) Finalmente se encuentra el ovario, en el se pueden observar su medula y su corteza, en esta última también se pueden identificar los cuerpos lúteos, folículos, cuerpos hemorrágicos y cuerpos albicans.

2.- PRÁCTICA DE RECONOCIMIENTO DE ESTRUCTURAS ANATÓMICAS DEL MACHO

MATERIAL

- Pinzas
- Tijeras
- Bisturí
- Guantes
- Regla

PROCEDIMIENTO

- A) Colocar el aparato reproductor del macho sobre la mesa en posición antero-posterior.
- B) En la región testicular se puede identificar la piel que se conoce como escroto, interior al escroto se encuentra el dartos que recubre al testículo y se une al agujero inguinal sobre el plexo pampiniforme.
- C) Más hacia el interior se encuentra el testículo, el cual está cubierto de la túnica albugínea y rodeado de una gran cantidad de vasos sanguíneos. Al cortar el testículo se observa una masa amorfa que contiene a los tubulos seminíferos y confluyen en el centro del testículo, en lo que se conoce como retetestis, que a la vez se une al epidídimo mediante los conductos deferentes.
- D) El epidídimo se divide en cabeza que se encuentra en la parte más proximal, el cuerpo se dirige hacia la parte más distal y cola se ubica en la parte más alejada del testículo de acuerdo a su implantación, finalmente la cola se une con el conducto eferente.
- E) El conducto eferente se une en el ámpula con la uretra y ésta última con las glándulas accesorias (Vesículas seminales, ámpula y glándulas bulbo uretrales) a través de su trayecto en el pene y glande.
- F) La parte final del pene y el glande están cubiertos por el prepucio que tiene en la parte externa la consistencia de piel y en la parte interna de mucosa.

II.- OBTENCIÓN DE SEMEN

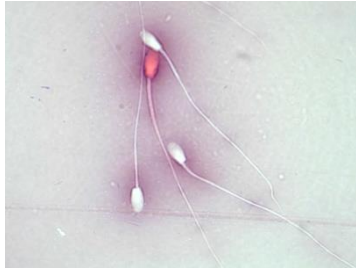
OVINOS
PERROS
CONEJOS

El mejor procedimiento para la colecta del semen (Ovino y Conejo), es el uso de vagina artificial, la unidad proporciona temperatura, presión y lubricación adecuada para provocar la eyaculación, y se conecta a un tubo calibrado para depositar el semen.

La técnica de la mano enguantada es la más usada para obtener semen en perros, la técnica consiste en aplicar un masaje suave con la mano enguantada sobre el prepucio hasta que el bulbo peneano empieza a aumentar de tamaño, aplicando estímulos púlsatiles alrededor y por detrás del bulbo, el macho empezará a excitarse por lo cual se coloca el vaso colector para obtener la muestra.

III.- EVALUACIÓN DE SEMEN

BOVINOS
OVINOS
CAPRINOS
PORCINOS
EQUINO
PERROS
GATOS



Este análisis tiene que tomar en cuenta las características macroscópicas (volumen y color) y microscópicas (concentración, motilidad en masa y progresiva, % de espermatozoides vivos y % de morfología) del eyaculado. Estas dos evaluaciones son complementarias para tener una idea de la calidad del eyaculado.

Para la determinación de las características macroscópicas se tomara en cuenta el color del eyaculado, siendo este de color blanquecino en el bovino, equino, caprino, ovino, canino y felinos, además la cantidad del eyaculado obtenido que será reportado en mililitros.

Una vez realizada la evaluación macroscópica se diluye la muestra de semen para la evaluación de las características microscópicas que es llevada a cabo en el laboratorio con la ayuda de microscopios, termo platina, pipetas Pasteur, Pipetas de Thomas, tubos cónicos, cámara de Neubauer, portaobjetos, cubreobjetos, tinción de eosina – nigrosina y gradillas.

Para determinar cada característica se emplean diferentes técnicas como son:

1.- EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD MASAL Y PROGRESIVA

MATERIAL

- Microscopio campo claro
- Platina
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pipeta Pasteur

PROCEDIMIENTO

Para determinar la motilidad masal es necesario depositar una gota de semen con la pipeta Pasteur en un portaobjeto que este en la platina a 37.5°C y se observa en el microscopio con el objetivo de 10x, es recomendable observar las orillas de la gota de semen para evaluar la cantidad de remolinos que se forman, a mayor cantidad de remolinos se le dará un valor de 1, a menor cantidad de remolinos se le dará un valor de 5, es decir los valores que se pueden dar a esta evaluación son de 1 a 5.

Para evaluar la motilidad progresiva se deposita una gota de semen diluido con la pipeta Pasteur en un portaobjetos que esta en la platina a 37.5°C junto con un cubreobjetos y se observa con un microscopio con el objetivo 10x, en esta evaluación se tomará en cuenta sólo los espermatozoides que presentan movimiento rectilíneo y desaparecen del campo de visión, entre más espermatozoides que tengan este movimiento se acercarán a un valor de 100% y entre menos presentan este movimiento o que tengan movimiento pero en un mismo lugar se

a cercarán a un valor de 0%, es decir el rango para calificar este tipo de movimiento será de 0% a 100%.

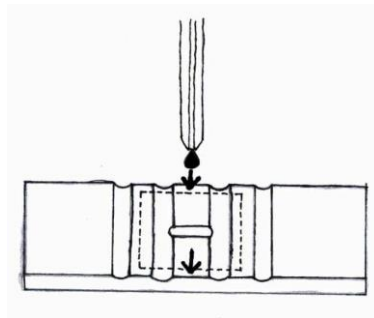
2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

MATERIAL

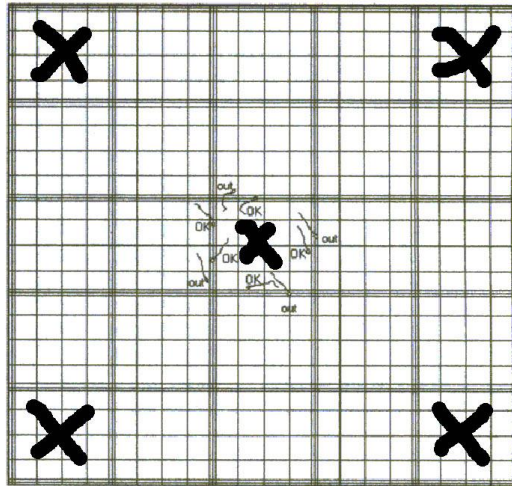
- Cámara de Neubauer
- Pipeta de Thomas
- Succionador
- Papel
- Cloruro de sodio al 4%

PROCEDIMIENTO

- A) Se succiona semen hasta la marca de 0.5 de la pipeta de Thomas.
- B) Después se succiona cloruro de sodio hasta la marca 101 (1:200) de la pipeta de Thomas.
- C) Con los dedos se tapa la boquilla de la pipeta de Thomas y se agita para que el agitador que esta en la pipeta de Thomas mezcle el semen con el cloruro de sodio.
- D) Se desechan las primeras 5 gotas en el papel.
- E) La sexta gota se deposita en la cámara.



- F) Con un microscopio de campo claro se enfocará con el objetivo de 10X, una vez encontrada la cuadrícula de la cámara se enfoca a 40X y se empieza a contar.
- G) Se contarán cinco cuadros, los cuatro de las esquinas y el del centro.



NOTA: se deberá de elegir las líneas a contar que serán la “superior izquierda o la “inferior derecha” para un conteo homogéneo en todos los cuadros a contar.

I) Cuando se tenga el conteo de las dos cuadrículas, se calculará un promedio y el resultado se multiplicara por 10^7 para obtener el número de espermatozoides por mililitro.

Por citar un ejemplo, se contaron en la cámara 125 espermatozoides en promedio, esta cantidad se multiplica por 10^7 y nos da como resultado 1250×10^6 espermatozoides/ml.

3.- PORCENTAJE DE VIABILIDAD Y MORFOLOGÍA

MATERIAL

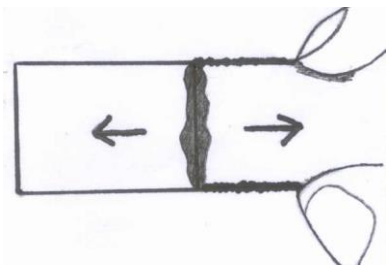
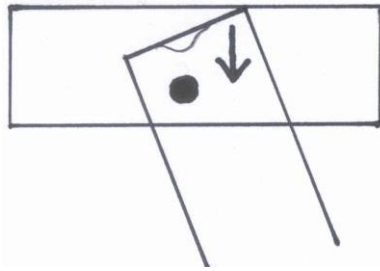
- Portaobjetos
- Tinción de Eosina-Nigrosina
- Microscopio de campo claro
- Aceite de inmersión
- Contador

PROCEDIMIENTO

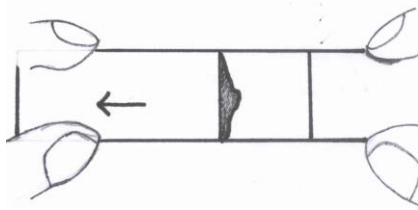
- I) Limpiar los portaobjetos a utilizar.
 J) Poner una gota de semen en el portaobjetos y una gota de tinción de Eosina-Nigrosina, tratando de que esta ultima sea de la misma cantidad a la gota de semen.



- K) Con el lado más corto de otro portaobjeto se jala la gota de semen hacia la gota de tinción y se mezclan con mucho cuidado evitando hacer un mezclado rápido e intenso.

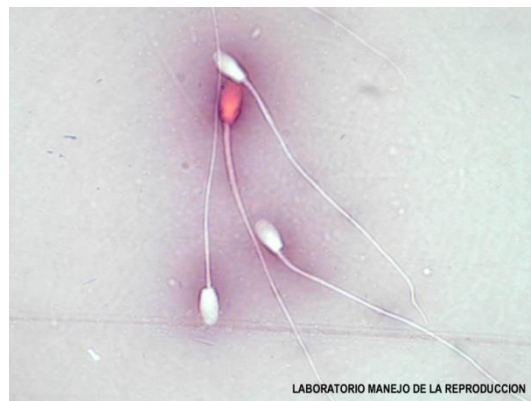


- L) En un tercer portaobjetos se hace el frotis, extendiendo la mezcla de semen – tinción de derecha a izquierda y nunca se debe hacer un frotis de forma contraria es decir, de izquierda a derecha.



- M) Se fija el frotis con calor de tal manera que se seque lo más rápido posible.
- N) Con un microscopio de campo claro se enfocará con el objetivo de 10X, después con el de 40X aumentando un poco la intensidad de luz, hasta el final se enfoca con el de 100X, para ver con este objetivo se utiliza una gota de aceite de inmersión en nuestra muestra y después se observa.
- O) Con la ayuda de un contador se registra las células tomando en cuenta el siguiente criterio:

Espermatozoide vivo	Si la cabeza del espermatozoide esta blanca y sin colorear.
Espermatozoide muerto	Si la cabeza del espermatozoide esta teñida o coloreada.



- P) Para la morfología del espermatozoide se observan 100 células con el objetivo de 100X, contando los espermatozoides normales y anormales según la clasificación de anomalías primarias y secundarias.

VI.- PUNCIÓN DE OVARIOS Y RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

El alumno deberá presentarse con bata blanca y limpia para realizar la práctica dentro del laboratorio, se registrará en bitácora de entrada (anotando nombre completo, hora de entrada y salida, procedencia o módulo, actividad a realizar) y llenará una papeleta para el préstamo de material.

Material

Al alumno se le proporcionará el siguiente material para realizar la práctica:

- Ovarios
- Medio TAL-Hepes
- 1 Jeringa de 10 ml
- 1 Aguja calibre 18 G
- 1 Tubo cónico de 50 ml
- 1 Caja de Petri grande
- 2 Cajas de Petri pequeñas
- Microscopio estereoscópico
- Boquillas para succión
- Manguera de latex para succionar
- Pipetas Pasteur con punta estirada
- Guantes de latex

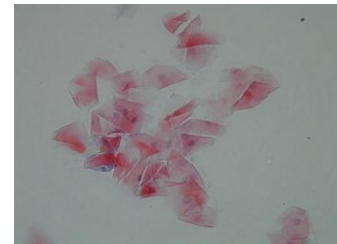
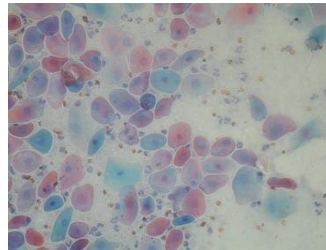
Técnica

6. Se toman con la jeringa dos mililitros de medio TAL-Hepes y se comienza a puncionar los ovarios, colocando el bisel de la aguja hacia abajo, se tomarán en cuenta solo los folículos de 3 a 7 mm de diámetro, aspirando la mayor parte del líquido folicular de estos.
7. Una vez que se hayan obtenido aproximadamente 6 ml de medio y líquido folicular se procederá a quitar aguja y se colocará el contenido de la jeringa en el tubo cónico, de nuevo se toman dos mililitros de medio y se continúa con el siguiente ovario.
8. Ya terminados los ovarios se deja sedimentar el medio por 15 minutos, se retira el sobrenadante y se le agregan 15 ml más de medio limpio para lavar los ovocitos, se deja sedimentar 15 minutos más y se quita el sobrenadante, se agrega un poco más de medio y se vierte todo en la caja de Petri grande para poder coleccionar a los ovocitos.
9. Se coloca la caja de Petri sobre el microscopio estereoscópico y se coleccionan los ovocitos succionándolos con las pipetas Pasteur con la menor cantidad de medio y se transfieren a una caja para su clasificación.
10. Los ovocitos serán clasificados bajo un aumento de 40X como aptos (categorías I y II) y no aptos (categorías III y IV) para la Maduración *in vitro* (MIV), basándose en las características de las células del *cumulus oophorus*, corona radiada y la homogeneidad del citoplasma.

- e) Ovocitos categoría I (Excelentes): presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 ó más capas compactas del *cumulus*.
- f) Ovocitos categoría II (Buenos): presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa, pero menos de 5 capas del *cumulus*.
- g) Ovocitos categoría III (Regulares): presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del *cumulus* presentes son menos compactas.
- h) Ovocitos categoría IV (Malos): presentan citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado y las células de la corona y del *cumulus* se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad.

V.- CITOLOGÍA VAGINAL EXFOLIATIVA EN PERRAS Y HÁMSTER

Mediante la técnica de Papanicolau se realiza el diagnóstico del momento adecuado del estro para hacer el cruzamiento o realizar la inseminación artificial en la perra. En el hámster es utilizada para precisar el momento del apareamiento.



PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR UNA CITOLOGÍA VAGINAL EXFOLIATIVA (CVE)

Entre las aplicaciones que se le ha dado a la citología vaginal exfoliativa se encuentran las siguientes: a) Diagnóstico funcional (grado de proliferación del epitelio vaginal, evaluando así la función hormonal para determinar el inicio de la pubertad, fase del ciclo estral y gestación), b) Detección de neoplasias (búsqueda de células tumorales para el descubrimiento precoz de un carcinoma).

La tinción de Papanicolaou se basa en la reacción química de los colorantes con los elementos celulares, su capacitación varía de acuerdo con el pH del medio intracelular. Es tricrómica a base de los colorantes de Hematoxilina (tiñe los núcleos), OG 6 (tiñe los citoplasmas transparentes) y EA 50 (tiñe los citoplasmas más densos).

Técnica:

Pasos de la tinción	Agente	Tiempos
1	Fijación con cito-spray o etanol 96%	15 min
2	Etanol 80%	Baños

3	Etanol 70%	Baños
4	Etanol 50%	Baños
5	Agua corriente	Baños
6	Hematoxilina	5 min
7	Agua corriente	Baños
8	Etanol 50%	Baños
9	Etanol 70%	Baños
10	Etanol 80%	Baños
11	Etanol 96%	Baños
12	Colorante OG-6	10 min
13	Etanol 96%	Baños
14	Colorante EA-50	10 min
15	Etanol 96%	Baños
16	Etanol absoluto	Baños
17	Etanol absoluto	Baños
18	Xilol	Baños
19	Xilol	Baños
20	Montar en resina sintética o Bálsamo de Canadá	

LA CITOLOGÍA VAGINAL EXFOLIATIVA EN LA PERRA DURANTE SU CICLO ESTRAL ES LA SIGUIENTE (Lacroix y Páramo, 1991)

Células	Proestro %	Estro %	Diestro %	Anestro %
Anucleadas	10	90	30	10
Superficiales	30	8	20	10
Intermedias	50	2	20	20
Parabasales	10	0	30	60
Neutrófilos	±	-	+	++
Eritrocitos	++	+	-	-

VIII.- DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN POR ULTRASONIDO

VACA
BORREGA
PERRA

El diagnóstico de gestación es de utilidad para establecer las prácticas de manejo adecuadas para el animal gestante o bien para incorporar a los animales no gestantes a su actividad reproductiva.



El SonoVet 2000 es un ultrasonido portátil de alta resolución y penetración profunda que cuenta con amplia variedad de funciones. A continuación se describirá el procedimiento de operación general. Para funciones específicas consulte con el personal de laboratorio.

- 1.- Conecte el adaptado de corriente a la consola en la entrada que se encuentra en la parte de atrás del aparato.
- 2.- Conecte el transductor en la entrada correspondiente al lado derecho de la consola.
- 3.- Conecte el aparato a la corriente eléctrica o utilice las baterías según sea el caso. **NUNCA encienda el aparato sin haber conectado primero el transductor.**
- 4.- El rango de rotación del monitor es limitado. NO lo gire más de 180°.
- 5.- Solo utilice el gel apropiado para el transductor. La utilización de cualquier otro producto puede dañarlo.
- 6.- Cuando haya terminado de usarlo, limpie el transductor con agua y jabón suave. Séquelo con papel absorbente cuidando no rayarlo. Desinfectelo con alcohol al 70%. No sumerja el cable del transductor más allá de la marca de seguridad. No use solventes o limpiadores abrasivos para limpiar ninguno de los componentes del aparato.
- 7.- Para guardar imágenes anote en la bitácora que se encuentra en el estuche del ultrasonido el número, especie y observaciones correspondientes a la imagen.
- 8.- Nunca utilice el ultrasonido sin la supervisión del personal del laboratorio.
- 9.- Apague el equipo con el interruptor y sólo entonces desconecte el transductor y guárdelo inmediatamente en el estuche.

IMPORTANTE: Siempre proteja al transductor de golpes, caídas o rayones pasando el cable alrededor de cuello mientras lo está usando.