

Análisis de ADN fetal libre de células en plasma materno de equinos y bovinos

Analysis of cell-free DNA in equine and bovine maternal plasma

Francisco José Valencia Alaix¹. Zoot, MSc; Juan Bautista López Ortiz¹, Biol.MSc; Silvia Elena Naranjo Elorza¹ Zoot Est Maestría.

¹GENTECH & C-Genera, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

En los sistemas de producción animal, el diagnóstico prenatal del sexo se convierte en una herramienta de gran importancia económica puesto que permite la optimización de la programación del presupuesto dada por la planificación de las ventas y/o distribución de las crías. Actualmente la determinación sexual del feto en especies domésticas como equinos y bovinos es realizada exclusivamente mediante ultrasonografía transrectal obteniéndose una confiabilidad de aproximadamente 80% a partir del segundo mes, sin embargo requiere de gran experiencia del personal que la realiza, además este no deja de ser un método invasivo que compromete el bienestar fetal, por lo tanto es pertinente la realización de investigaciones que permitan contar con métodos alternativos en el diagnóstico sexual prenatal de manera rápida, confiable, sin limitación de tiempo y no invasiva. Se estima que entre 2 a 6% del ADN circulante en la sangre materna es de origen fetal, el cual puede ser amplificado mediante PCR con el fin de detectar regiones específicas de los cromosomas sexuales como SRY en el cromosoma Y. Esta práctica ha sido desarrollada desde 1997 en diagnóstico prenatal en humanos con una confiabilidad del 100% incluso en estudios realizados a mujeres con solo cuatro semanas de gestación; no obstante en Colombia este método no ha sido muy difundido ni extrapolado a otras especies probablemente por el escaso uso rutinario de técnicas moleculares para diagnósticos en animales. Esta investigación tiene como objetivo determinar si el análisis de ADN fetal libre en sangre materna constituye una herramienta efectiva en el diagnóstico sexual prenatal en equinos y bovinos. Con este fin se toman muestras de 5 ml de sangre periférica en EDTA de hembras entre 3 y 8 meses de gestación, se realiza la extracción de ADN y la amplificación por PCR: obteniéndose resultados positivos de 60% para presencia de ADN y 30% para amplicones de las regiones a evaluar. Debido a que las hembras aún no han culminado su periodo de gestación estos resultados no han permitido establecer la correlación entre el genotipo y el fenotipo neonatal.

Palabras clave: diagnóstico prenatal no invasivo, PCR, SRY, sexo fetal.

Key words: fetal sex, noninvasive prenatal diagnosis, PCR, SRY.

Aplicación de técnicas moleculares para identificación y monitoreo de microorganismos metanogénicos de bovinos en pastoreo

Application of molecular techniques for identification and monitoring of methanogenic microorganisms in grazing cattle

Erika Andrea Angarita Amaya¹, Zoot, Esp; Olga Lucía Mayorga Mogollón¹, Química, MSc, PhD

¹Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. C.I. Tibaitatá.

El impacto que tienen los sistemas de producción bovina sobre el cambio climático por las emisiones de metano producto de la fermentación ruminal, ha incrementado el interés en identificar y conocer el comportamiento de la población de microorganismos metanogénicos del rumen, responsables de la metanogénesis. Muchos trabajos han creado librerías e identificado bajo diferentes

condiciones climáticas, raciales y alimenticias el comportamiento de las especies metanogénicas del rumen. En este estudio, se pretende examinar la diversidad y cantidad de metanógenos totales en el rumen de nueve vacas no lactantes bajo tres diferentes praderas constituidas por *Pennisetum clandestinum* y *Lotus uliginosus* en diferentes proporciones, ubicados en la Sabana de Bogotá. Utilizando metodologías basadas en el gen 16s ARNr, con la región hipervariable V3, la Electroforesis en Gel con Gradiente Denaturante (PCR-DGGE) y Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) permitieron establecer la diversidad y cantidad de metanógenos totales dependiendo la dieta. Se logró establecer por medio de análisis de agrupamiento UPGMA, tres grandes *clusters* que presentan el efecto de la dieta sobre la diversidad de los metanógenos del rumen. En cuanto a la cantidad de esta población expresados como los ng/g de materia seca (MS) de contenido de rumen, se encontró una mayor cantidad de metanógenos ($p < 0.001$) en los animales que consumieron la asociación entre la gramínea y leguminosa. A pesar de no contar con técnicas de identificación como clonación o secuenciación, a partir de los perfiles creados por PCR-DGGE, gracias a reportes previos, se asume que las familias *Methanobrevibacter* y *Methanophaera* se encuentran presentes en vacas bajo pastoreo en la Sabana de Bogotá.

Palabras clave: archaeas, *Lotus uliginosus* (lotus), metano, *pennisetum clandestinum* (kikuyo).

Key words: archaeas, *Lotus uliginosus* (lotus), methane, *pennisetum clandestinum* (kikuyo).

Asociación del locus BoLA-DRB3.2 con el virus de la leucosis bovina en el ganado criollo colombiano*

Association between the locus BoLA-DRB3.2 and bovine leukemia virus in creole colombian breeds

Darwin Yovanny Hernández Herrera¹, Zoot, MSc, Est PhD; Andrés M Posso Terranova¹, Biol, Est MSc; Javier Antonio Benavides¹, MVZ, MSc, Est PhD; Jaime Eduardo Muñoz Flórez², IA, Esp, (c)PhD; Guillermo Giovambattista², Biol, PhD; Luz A Álvarez Franco¹, Zoot, MSc, PhD.

¹Programa de Recursos Zoogenéticos, Laboratorio de Genética Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, AA 237, Colombia. ²Instituto de Genética Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, AA 296, Buenos Aires, Argentina.

*Financiado por la Dirección Nacional de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia.

El complejo mayor de histocompatibilidad de los bovinos es conocido como Antígeno de los Leucocitos Bovinos (BoLA) y se localiza en el cromosoma 23. El gen DRB3.2* ha sido asociado con caracteres productivos (producción de leche, proteína y grasa de la leche) y con enfermedades (linfocitosis persistente, carga proviral). El objetivo del presente trabajo fue asociar los alelos del gen BoLA-DRB3.2* con la presencia del virus de la leucosis bovina (VLB) en las razas criollas y colombianas. En 330 muestras de ADN de ocho razas bovinas criollas (GCC): Blancorejinegro (BON), Caquetéño (CQT), Casanareño (CAS), Costeño con Cuernos (CCC), Chino Santandereano (ChS), Hartón del Valle (HV), Romosinuano (RS) y San Martinero (SM), dos razas sintéticas colombianas Lucerna (LUC) y Velásquez (VEL) y dos controles Brahmán (B) y Holstein (H) se evaluó la presencia del VLB por detección del provirus mediante PCR anidada, los polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2* por PCR semianidada-RFLP y la asociación entre ambos. Se encontró menor porcentaje de presencia del VLB en las razas criollas y colombianas (31.3%) que en los controles (38.2%) siendo mayor en las razas de la región Andina que en los Llanos Orientales y el Norte de Colombia. Hubo mayor presencia del VLB en las hembras que en los machos (21.7 y 4.6, respectivamente). Se hallaron 41 alelos BoLA-DRB3.2*, alta diversidad genética ($H_e = 0.878 \pm 0.057$), diferenciación genética ($F_{st} = 0.044$, $p < 0.01$) y coeficiente de endogamia ($F_{is} = 0.249$, $p < 0.01$). En el GCC se encontró asociación entre la

ausencia del VLB y los alelos *21, *24 y *37, clasificados como resistentes y entre la presencia del VLB y los alelos *6 y *42, clasificados como susceptibles. En los controles se encontró asociación positiva con el alelo *13 y negativa con los alelos *23 y *28. El 10% del GCC fue genotipificado como RR, el 2.5% como SS y el 57% fue de genotipo neutral (NN). Los resultados indican que el ganado criollo colombiano posee genes de resistencia a leucosis bovina enzootica.

Palabras clave: bovinos criollos, complejo mayor de histocompatibilidad, marcadores moleculares, resistencia a leucosis.

Key words: creole bovines, disease resistant, histocompatibility complex, molecular markers.

Biorés: un producto biotecnológico de fermentación sólida aprovechando residuos agroindustriales para alimentación de rumiantes*

Biorés: a biotechnological product from solid fermentation using agroindustrial residues for ruminants feeding

Byron Díaz Monroy¹, Ing, Zootecnista, MSc; Elaine Valiño Cabrera, Doctora en Ciencias² Arabel Elías Iglesias, Doctor en Ciencias²

¹Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Pecuarias. Laboratorio de Biotecnología animal. Riobamba, Ecuador. ²Tutor Instituto de Ciencia Animal "ICA" San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

*Investigación financiada por SENESCYT (Secretaría Nacional de Educación Superior; Ciencia y Tecnología) del Ecuador

En Ecuador, ante los altos costos de alimentación de rumiantes zootécnicos, se aprovechó residuos de cosecha de maíz mediante fermentación sólida con bioacelerantes (excretas de ganado y suero de leche) obteniendo "Biorés" producto alimenticio de calidad y buen valor nutricional. Los bioacelerantes produjeron ácidos orgánicos descendiendo el pH y eliminando patógenos, sus enzimas degradaron la fibra (50%) mejorando la digestibilidad e incorporaron microorganismos como biomasa aportando proteína (100%), en períodos de tiempo cortos (20 días), pudiendo reemplazar gradualmente a concentrados. Hubo cuatro fases: aislamiento de cepas biodegradadoras, caracterización de sustratos, producción de biorés y pruebas *in vivo*, evaluando la respuesta del biorés (90% rastrojo de maíz, 3.5% melaza, 1% sales minerales, 2% urea y 3.5% de bioacelerantes), en: Engorde de 15 corderos Rambouillet, 5 meses edad, diseño bloques completamente al azar, 45 días ensayo, el tratamiento biorés más alfalfa, alcanzó mejores parámetros productivos: incremento de peso diario, conversión alimenticia y rentabilidad económica de 0.108 kg, 8.14 y 22%, respectivamente contra 0.985 kg, 9.65 y 19% del testigo (mezcla forrajera), sin encontrarse diferencias estadísticas, Duncan (0.01). Mejor digestibilidad para materia seca, fibra bruta y energía digestible (Mcal/kg MS), hubo con el biorés, con 79.38%, 70.20%, y 3.00 respectivamente, sin superar estadísticamente al testigo con: 77.90%, 67.95% y 2.97, respectivamente. Engorde de 12 novillos mestizos: 18 meses edad, diseño bloques completamente al azar, tres repeticiones, peso promedio inicial 232.25 kg, 75 días ensayo, biorés reportó los mejores resultados: incremento de peso, conversión alimenticia y rentabilidad económica de 0.50 kg/día, 20.29 y 37%, respectivamente, mientras el testigo (mezcla forrajera): 0.18 kg/día, 62.94 y 13%, respectivamente, estableciéndose diferencias significativas, Duncan (0.01). En 16 vacas Holstein mestizas, 4 años edad, tres partos, primera fase producción. Producción de leche: 11.86 litros/vaca/día, costo producción: 0.15 dólares/litro, frente al testigo (ensilaje de rastrojo de maíz sin bioacelerante): 9.41 litros/vaca/día y costo de 0.19 dólares/litro, encontrándose diferencias significativas, Tukey (0.01). Se realizó prueba de aceptabilidad en 20 apacas sin determinar parámetros productivos. Esta tecnología fue transferida al sector ganadero del Ecuador y actualmente se aplica con éxito en varias fincas.

Palabras clave: bioacelerante, suero de leche, sustrato.

Key words: bioacelerant, serum of milk, substrate.

Caracterización morfológica y molecular de la gallina criolla (*Gallus domesticus*) en los departamentos de Nariño, Putumayo, Valle del Cauca y Chocó

Phenotypic and molecular characterization of *Gallus domesticus* in Nariño, Putumayo, Valle del Cauca and Chocó

Herman Alberto Revelo Cuaspu¹, Est Zoot ; Julia Victoria Arredondo Botero², Zoot, (c)PhD; Jaime Eduardo Muñoz Flórez², Ing Agron, Esp, (c)PhD; Luis Emilio Arenas Martínez², Ing Agron; Esildo Pacheco Mosquera³, Abogado; Janis Liris Mosquera Sanchez⁴; Luz Ángela Álvarez Franco², Zoot, MSc, PhD.

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira; ²Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. ³Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. ⁴Consultor; ⁵Instituto de Estudios Ambientales del Pacífico (IIAP). ⁶Consejo Comunitario Local de Puerto Meluk (Chocó)

La gallina criolla se caracteriza por tener algunas ventajas como cloquera, habilidad materna, rusticidad, sin embargo es poco lo que se conoce acerca de su diversidad y rasgos fenotípicos. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo realizar la caracterización morfológica y molecular de gallinas criollas (*Gallus domesticus*) en los departamentos de Nariño, Putumayo, Chocó y Valle del Cauca. Se obtuvieron 123 aves criollas que fueron analizadas usando marcadores morfológicos y moleculares RAMs en el laboratorio de Genética Animal de la Universidad Nacional de Colombia. Para la evaluación morfológica se empleó la técnica visual con el apoyo de la referencia fotográfica de cada individuo, se usaron diez caracteres cualitativos: morfología de pluma, distribución de pluma, patrón del plumaje, color del plumaje, color de los tarsos, color de lóbulo de la oreja, tipo de cresta, tamaño de cresta color de los ojos y variantes esqueléticas. Para evaluar la diversidad genética se usaron siete cebadores RAMs (Random amplified microsatellites) que produjeron 105 bandas polimórficas con pesos moleculares entre 100 y 1200 Kb. El valor promedio de heterocigosidad esperada fue de 0.35 y el F_{ST} fue 0.04 ± 0.07 . El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que el 15% de la varianza total corresponde a las diferencias entre las poblaciones y el 85% dentro de las poblaciones. El análisis de correspondencia múltiple (ACM) mostró claramente tres grupos, el primero conformado por individuos del río Dubasa (Chocó), el segundo con animales de Puerto Meluc y Bahía Solano (Chocó) y el último grupo formado por aves de Putumayo, Nariño y Valle del Cauca. La prueba de Mantel $R = -0.060$ indicó que no existe correlación entre los datos morfológicos y moleculares.

Palabras clave: aves locales, diversidad genética, microsatélites RAMs.

Key words: genetic diversity, local poultry, RAMs microsatellites.

Detección coprológica y molecular de *Anoplocephala perfoliata*, en equinos del departamento del Valle del Cauca

Detection coprologic and molecular *Anoplocephala perfoliata*, horses in the valley of the department

Luz Marina Barrera V^{1,2}, Zoot, (c)MSc; Luz Ángela Álvarez Franco^{1,3}, Zoot, MSc, PhD; Andrés Mauricio Posso T⁴, Biól; Jaime Eduardo Muñoz Flórez^{1,3}, Ing, Agron, Esp, (c)PhD.

¹Grupo de Investigación en Diversidad Biológica Universidad Nacional de Colombia sede Palmira

²Estudiante de Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en Producción Animal Tropical ³Profesor Asociado

⁴Biólogo, técnico de Laboratorio Biología Molecular

Anoplocephala perfoliata, causa pérdidas económicas para la industria equina, debido principalmente a los problemas intestinales que desencadena (cólico). Se evaluó su presencia mediante técnicas de diagnóstico coprológico (sedimentación/flotación) y técnica molecular PCR para el reconocimiento del cestodo en 59 caballos, con el objetivo de estandarizar los métodos moleculares para detectar *A. perfoliata* en materia fecal en equinos. Se utilizaron muestras de heces equinas de los municipios del Valle del Cauca: Sevilla, Dagua, Palmira, Tarragona, Florida, Villagorgona y Hacienda El Paraíso. De cada muestra recolectada, se pesaron 40 g y se diluyeron en 10 ml de agua, posteriormente se filtró la mezcla a través de una gasa doble vertiendo en dos tubos de ensayo de 15 ml, se centrifugó por 10 minutos a 2700 rpm. Se utilizó el kit DNEASY de

QIAGEN, para extraer ADN de un ejemplar de la *A. perfoliata*, como control positivo. Para la extracción del ADN fecal se utilizó el método fenol-cloroformo. Mediante el Diagnóstico Molecular por PCR se amplificaron regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del ADN de *Anoplocephala perfoliata* basados en el protocolo de la PCR anidada. En la primera PCR se utilizarán cebadores que amplifican regiones parciales como la: 18S, ITS-1, 5.8S, ITS-2, y 28S del ADN de *A. perfoliata* con los cebadores S18 (5'-TAACAGGTCTGTGATGCC-3') y L3T (5'-CAACTTCCCTCACGGTACTTG-3'). Basados en las secuencias obtenidas de *A. perfoliata*, se utilizaron para la PCR anidada dos cebadores que amplifican la región ITS-2. Como resultado el 25% con la técnica coprológica y del 33.3% con el método molecular fueron positivos, indicando que el diagnóstico molecular por PCR anidada, representa un valioso método para la detección específica de *Anoplocephala perfoliata* en muestras fecales de caballos y tiene ventajas sobre el método coprológico, por su especificidad. El trabajo de investigación busca contribuir a la comprensión y avance del conocimiento de los principios fundamentales biológicos y al desarrollo de mejores medios para la protección de la salud y el bienestar del animal y avanzará en el diagnóstico molecular de céstodos en equinos para realizar una detección temprana del parásito e implementar técnicas de control y manejo de los mismos, reduciendo el riesgo de cólicos inespecíficos en los equinos.

Palabras clave: *Anoplocephala perfoliata*, PCR anidada, primers.

Key words: *Anoplocephala perfoliata*, nested PCR, primers.

Detección del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en diferentes hatos del Valle del Cauca, usando la técnica de biología molecular RT-PCR

Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in different herds from Valle del Cauca, using molecular biology technique RT-PCR

Mabel Coronado Vélez^{1,2}, Zoot, (c)MSc; Luz Ángela Álvarez Franco^{2,3}, Zoot, MSc, PhD; Jaime Eduardo Muñoz Flórez^{2,3}, IA, PhD.

¹Estudiante de maestría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira

²Grupo de investigación en Diversidad Biológica, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, ³Profesor Asociado.

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es miembro del género pestivirus de la familia Flaviviridae, tiene distribución mundial, afecta a los rumiantes, causa problemas reproductivos y se asocia con otros patógenos del tracto respiratorio y digestivo. En Colombia, las pérdidas ocasionadas por enfermedades reproductivas se estiman en 44.000 millones de pesos anuales y se infiere que el VDVB juega un papel importante debido a la alta prevalencia de la enfermedad (50-58%), siendo su diagnóstico una de las mayores limitantes. Existen diversas metodologías como el aislamiento viral el cual es 100% específico y altamente sensible, pero su costo es alto; la inmunofluorescencia que es una prueba rápida con la desventaja que la interpretación de los resultados depende de la experiencia del observador. Otras técnicas como ELISAs, Inmunohistoquímica (IHQ) y seroneutralización pueden generar falsos negativos. Por lo tanto, se hace necesario estandarizar pruebas moleculares como la RT-PCR, la cual haría posible la realización de un diagnóstico con una alta sensibilidad, especificidad y a un menor costo. El presente trabajo tiene como objetivo detectar la presencia del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en diferentes hatos del Valle del Cauca, usando la técnica RT-PCR y se está desarrollando en el laboratorio de Biología Molecular en la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Se colectaron 100 muestras de diferentes razas de ganado bovino, la extracción de ARN viral se hizo usando el Mini Kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN) y la detección del virus con el kit OneStep RT-PCR. Hasta el momento esta metodología ha permitido estimar tasas de animales infectados por el virus en el Valle del Cauca. Con esta investigación se pretende proponer recomendaciones respecto al manejo, control, prevención de esta enfermedad y de esta manera contribuir al desarrollo de medios para la protección de la salud y el bienestar animal.

Palabras clave: ARN, prevalencia, pestivirus.

Key words: RNA, pestivirus, prevalence.

Determinación de perfiles electroforéticos de proteínas del plasma seminal de toros Cebú Brahman y Sanmartinero, y su correlación con las variables de calidad seminal

Determination of electrophoretic profiles of seminal plasma proteins and Sanmartinero Brahman Zebu bulls and its correlation with semen quality variables

Nidia Sánchez Díaz¹, Biól; Rocío Fenney Herrera¹, Zoot; Fabian Rueda¹, Zoot, MSc; Guillermo Velásquez Penagos², MV, MSc, PhD; Miguel Ángel Peña², MV; Jaime Cardozo Cerquera¹, MV, MSc, PhD.

¹Investigadores del Laboratorio de Microbiología Molecular, CBB-CORPOICA, rherrera@corpoica.org.co. ²Investigadores CRIA-CORPOICA, jgvelasquez@corpoica.org.co

El plasma seminal es una mezcla de fluidos provenientes del epidídimo y las glándulas sexuales accesorias y puede afectar la morfología, la reacción acrosómica y la fertilidad del espermatozoide. En los últimos años se han estudiado varias de sus proteínas, en especies como el porcino, el equino, el ovino, el bovino y el humano, encontrándose diferencias en la composición proteica y su asociación con la fertilidad de las mismas. Investigaciones de CORPOICA, evidenciaron mayor porcentaje de penetración espermática de oocitos en toros criollos Sanmartinero que en toros Cebú, se estableció también niveles superiores de ácido cítrico y pirúvico, en plasma seminal de los toros criollos. Sin embargo, no existen estudios de las relaciones entre proteínas del plasma seminal y las variables de calidad seminal, consideradas como señales del funcionamiento del espermatozoide. El objetivo de este estudio fue determinar los perfiles electroforéticos ID SDS-PAGE, de las proteínas del plasma seminal de toros Cebú Brahman y Sanmartinero, y establecer las correlaciones con las variables de calidad seminal. Se colectaron y analizaron tres muestras seminales de cada uno de los nueve toros por raza analizada. El plasma seminal se obtuvo por centrifugación, previa determinación de los valores de viabilidad, motilidad y concentración espermática. Las proteínas del plasma se separaron por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE. La evaluación de la calidad seminal evidenció valores superiores ($p < 0.05$) de viabilidad y concentración espermática ($p < 0.01$) en toros Sanmartinero. Los mapas electroforéticos unidimensionales, detectaron la presencia de 23 bandas de proteína en el plasma seminal de toros Sanmartinero y 17 en los Cebú con pesos moleculares entre 7 kDa y 174 kDa, las bandas de 13, 15 y 25 kDa presentaron mayor concentración relativa. Solo se presentaron correlaciones de proteínas con variables de calidad en los toros Sanmartinero. La banda de 72 kDa correlacionó ($p < 0.01$; $r = 0.70$) con la viabilidad, sugiriendo un papel importante en el mantenimiento de la integridad y estabilidad de la membrana del espermatozoide del toro Sanmartinero.

Palabras clave: calidad seminal, electroforesis, proteínas de plasma seminal.

Key words: electrophoresis, seminal plasma proteins seminal quality.

Diseño de una herramienta informática para el seguimiento en la utilización de las principales biotecnologías reproductivas en Colombia

Design of a informatics tool for monitoring the use of principal reproductive biotechnologies in Colombia

Andrés F Ruiz J¹, MV, cMS; Nérida Rodríguez-Osorio², MV, MS, PhD; Gustavo García³, Zoot, MS.

¹Grupo de Investigación INCA-CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES, Medellín, Colombia. ²Grupo de Investigación Centauro, Universidad de Antioquia Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ³Profesor de Informática Avanzada, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Grupo de Investigación GRICA, Universidad de Antioquia

El sector ganadero nacional viene presentando un crecimiento importante en los últimos diez años, así como la Biotecnología Reproductiva (BR) se encuentra en un proceso de crecimiento exponencial en producción científica y aplicación a nivel internacional y nacional. Es importante conocer y documentar el estado del arte de la BR en Colombia, estimar el total del mercado y la participación de las diferentes empresas, conocer los resultados obtenidos y tener a disposición una Herramienta Informática (HI) para tomar, almacenar e interpretar los datos de los

trabajos realizados en las empresas que ofrecen servicios. Se realizará un estudio descriptivo prospectivo de corte; luego de completar una base de datos con las principales empresas de BR en Colombia, se contactarán telefónicamente y por correo electrónico invitándolos a participar en la investigación; se les realizará una encuesta y de ser necesario se visitarán para buscar su vinculación; se desarrollará paralelamente una HI en Excel, basados en otras disponibles, se buscará que sea amigable, fácilmente utilizable y completa para manejar la información necesaria en los programas de BR; se entregará a las empresas que deseen aportar información y mejorar su desarrollo para que la utilicen en el seguimiento de sus trabajos. Se obtendrán los datos de manera homogénea en dicha herramienta y se analizará la información de los trabajos realizados; finalmente se podrá establecer si con la HI es suficiente para el seguimiento de los trabajos y el análisis de la información o si es necesario posteriormente desarrollar un Software de mayor complejidad. La información obtenida en Excel, se organizará y depurará la base de datos para ser corrida en el programa estadístico SPSS versión 18. Se utilizará la estadística descriptiva para ilustrar la utilización de las BR bovinas en el país, mostrar los resultados obtenidos y los volúmenes de trabajo buscando cuantificar el mercado total y la participación de las diferentes empresas. Adicionalmente se consultarán otras fuentes que ayuden a conocer el total del mercado. Con ello se busca avanzar en el conocimiento de la utilización de la BR en Colombia, identificar y plantear necesidades prioritarias a resolver en dicho segmento.

Palabras clave: *biotecnología reproductiva, estado del arte, ganadería, técnicas de reproducción asistida.*

Key words: *assisted reproduction techniques, livestock, reproductive biotechnologies, state of the art.*

Diversidad genética de ovinos criollos colombianos*

Genetic diversity of colombian creole sheep

Nini Johana Vivas Ascue¹, Zoot, (c)MSc, Jaime Eduardo Muñoz Flórez², IA, (c) PhD, Moris Bustamante³, MVZ; Luz Ángela Álvarez Franco², Zoot, MSc, PhD.

*Proyecto financiado por la División de Investigación Palmira (DIPAL) - Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

¹Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 3155019509 ²Docente Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 2717000 ext. 35740-35739.

³Docente Universidad de Córdoba, Colombia.

Con la llegada de los conquistadores españoles se introdujeron ovinos al continente americano, los cuales constituyeron la base racial del ganado lanar en América. En Colombia están presentes las razas: Ovino Criollo Colombiano de Lana (OCL), Mora Colombiana (MC) y los Ovinos Criollos Colombianos de pelo: variedades Sudán (OCS), Etiopie (OCE) y Abisinio (OCA). El criollo es un animal rústico, de gran fertilidad, su amplia adaptación hace que fácilmente se encuentre desde las zonas áridas de la Guajira hasta los páramos húmedos de la zona Andina. El sector ovino colombiano se maneja en sistemas de producción extensivos, sin información ni control, con baja productividad y calidad, y cruzamientos indiscriminados con razas foráneas que han disminuido el número de animales puros. El objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento de los ovinos criollos colombianos mediante el estudio de su diversidad genética, estimar el grado de endogamia, la diferenciación entre y dentro de razas y comprobar si hay diferencias genéticas entre variedades de los ovinos de pelo. Con el propósito de realizar aportes en planes de mejoramiento y en su conservación, un total de 300 muestras de sangre de ovinos criollos (OCL, MC, OCS, OCE y OCA) fueron colectadas en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Córdoba, Nariño, Tolima, Cesar y Valle del Cauca. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de *Salting out*. De un panel de 30 microsatélites utilizados ampliamente en estudios de diversidad genética se amplificaron los sistemas ILSTS11, MAF65, BM1824, SPS115, BM8125, TGLA122, CSR247, D5S2, MAF209, INRA006, INRA35, BM6506, ETH10, ETH225, INRA63, TGLA126, TGLA53, BM6526, RM006 y OarCP34. Se estimarán las frecuencias alélicas, la heterocigocidad inesgada y los índices de fijación. El análisis estadístico se realizará mediante AMOVA, el software TFPGA y Structure. Los resultados aportarán al proyecto Diversidad Ovina Iberoamericana (<http://biovis.jimdo.com/>) de la Red Conbiand (Asociación sobre la Conservación de la Biodiversidad de los Animales Domésticos Locales para el Desarrollo Rural Sostenible).

Palabras clave: *ADN, marcadores microsatélites, PCR.*

Key words: *DNA, microsatellites markers, PCR.*

Efecto de diferentes antioxidantes sobre la calidad de semen equino congelado y vitrificado

Effect of different antioxidants on quality of frozen and vitrified stallion semen

Giovanni Restrepo Betancur, Zoot, MV, MSc, cPhD¹; Jorge Gómez Oquendo, MV²; Benjamín Alberto Rojano, Química, MSc, PhD³

^{1,2}Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid ³Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

Uno de los principales factores que limita la utilización de semen equino en procesos de reproducción asistida es la producción excesiva de especies de oxígeno reactivas (ROS), asociada a la criopreservación. Se ha evidenciado que el estrés oxidativo promueve en los espermatozoides la fragmentación del ADN, y la alteración de proteínas, de la actividad mitocondrial, y de la integridad de las membranas. A pesar de que se han probado múltiples antioxidantes en búsqueda de proteger los espermatozoides del estrés oxidativo, como sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa), y vitaminas (ácido ascórbico y α -tocoferol), pocos resultados positivos han demostrado efectividad en el mantenimiento de la fertilidad del semen criopreservado. Se sugiere que la criopreservación conduce a la pérdida de la actividad de defensa antioxidante, debido al daño estructural del citoesqueleto, y a la alteración de las enzimas antioxidantes. Recientemente se han desarrollado protocolos de criopreservación ultrarrápida (vitrificación), distinguidos por su menor impacto perjudicial en las estructuras celulares y por un mayor mantenimiento de la movilidad. En nuestro laboratorio hemos observado porcentajes de movilidad progresiva posteriores a la congelación rápida y vitrificación, del 55% y 40% respectivamente. El objetivo de esta investigación es evaluar el efecto de diferentes antioxidantes naturales sobre algunos parámetros de integridad estructural de los espermatozoides equinos y su movilidad, después de su criopreservación por congelación rápida y vitrificación. Se recolectará un total de 15 eyaculados provenientes de 5 machos equinos. El semen será criopreservado por metodologías de congelación rápida por exposición a vapores e inmersión en nitrógeno líquido, y mediante vitrificación en crioviales. Post-descongelación, se evaluará la funcionalidad de membrana plasmática por la técnica SYBR14/IP, la actividad mitocondrial por JC-1, y la integridad del ADN por la prueba TUNEL; mientras la movilidad espermática será determinada mediante análisis computarizado (CASA). La evaluación estadística se realizará por ANOVA, y comparación de medias por la prueba Duncan. Como perspectiva se pretende mejorar las condiciones de criopreservación de semen equino mediante la adición de antioxidantes naturales, con el fin de aportar a los procesos de reproducción asistida y de biotecnología reproductiva para dicha especie.

Palabras clave: *criopreservación, fertilidad, isoespintanol, timol.*

Key words: *cryopreservation, fertility, isoepintanol, thymol.*

Efecto de dos protocolos de congelación y del plasma seminal sobre el estado redox de semen equino criopreservado

Effect of two freezing protocols and seminal plasma on the redox state of equine cryopreserved semen

Edison Jair Pizarro López¹, Zoot, cMSc; Giovanni Restrepo Betancur², Zoot, MV, MSc, cPhD; Benjamín Alberto Rojano³, Químico, MSc, PhD

¹Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, ²Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, ³Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

La fertilidad de espermatozoides equinos criopreservados es inferior a la que presentan en el semen fresco. Diversos factores como la velocidad de enfriamiento y la solución de congelación pueden generar estrés oxidativo y afectar su capacidad fecundante. Los espermatozoides equinos son susceptibles al estrés oxidativo debido principalmente a la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas y a la baja cantidad de enzimas antioxidantes en su citoplasma. La reducida fertilidad muchas veces ha sido correlacionada con una baja capacidad antioxidante en la solución de congelación cuando el plasma seminal es removido durante los procesos convencionales de criopreservación. Estudios recientes han demostrado un efecto benéfico del plasma seminal a concentraciones inferiores al 20% en medios de congelación sobre la movilidad espermática; lo cual es atribuido a su contenido de enzimas antioxidantes. De igual forma se ha observado un efecto favorable de los protocolos congelación rápida sobre la integridad y funcionalidad

de los espermatozoides equinos. El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto del plasma seminal y de diferentes protocolos de criopreservación sobre el estado redox, la actividad de enzimas antioxidantes, y la capacidad fecundante de semen equino criopreservado. Para lo cual se criopreservará semen de 5 equinos, bajo protocolos de congelación rápida y lenta convencional, utilizando un diluyente suplementado con diferentes concentraciones de plasma seminal (5 y 20%). Se evaluará el estado redox del semen diluido mediante metodologías TBARS y *cis*-ácido parinámico, al igual que se determinará la actividad antioxidante por el método ABTS, y la capacidad fecundante por evaluación de movilidad en sistema CASA, funcionalidad de la membrana plasmática por prueba HOST y vitalidad por Test supravital. Para el análisis estadístico se realizará un análisis de varianza en base a un diseño experimental de bloques al azar con arreglo factorial y comparación de medias por prueba Tukey. Como resultado preliminar se obtuvo un promedio de movilidad progresiva del 55% en semen equino suplementado con un 20% de plasma seminal y criopreservado por congelación rápida. Como perspectiva se busca obtener protocolos de criopreservación de semen equino más eficaces en el mantenimiento de la calidad de espermatozoides equinos.

Palabras clave: ácidos grasos poliinsaturados, capacidad fecundante, enzimas antioxidantes, estrés oxidativo.

Key words: antioxidant enzymes, fertilizing capacity, oxidative stress, polyunsaturated fatty acids.

Efecto de la sustancia crioprotectora y nivel de glucosa sobre la viabilidad de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) conservados a -14 °C*

Effect of cryoprotectants and glucose levels on viability of Cachama Blanca (Piaractus brachyomus) embryos conserved at -14 °C

Javier Gonzáles Gonzáles^{1,2}, MV, cMSc; Eduardo Losada Castillo^{1,2}, MV, cMSc; Nubia Estella Cruz Casallas^{1,2}, Ing Agrón, cMSc; Pablo Emilio Cruz-Casallas², MVZ, MSc, PhD; Víctor Mauricio Medina Robles², MVZ, MSc

*Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana – IIOC, convocatoria proyectos de maestría 2010. Estudiante de Maestría en Acuicultura Continental, Universidad de los Llanos. ²Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos – GRITOX, Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, Villavicencio, Meta – Colombia. mauriciomedina77@gmail.com.

La estandarización de protocolos de congelación para el almacenamiento de embriones de peces, se plantea como una estrategia de conservación de especies nativas en peligro de extinción y para la producción fuera de la época reproductiva de aquellas de interés comercial. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de cuatro crioprotectores y dos niveles de glucosa, sobre la viabilidad y eclosión de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*). Los embriones provinieron de animales adultos, previa inyección intramuscular de extracto de hipófisis de carpa a dosis de 5,75 mg/Kg (hembras) y 4 mg/Kg (machos) de peso corporal. Se evaluaron 16 tratamientos (n=4) así: cuatro crioprotectores [metanol (MET), dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol (ETG) y dimetilacetamida (DMA)] en dos concentraciones (12 y 20%), conteniendo dos niveles de glucosa (10 y 17%). La incubación se realizó en incubadoras Woynarovich de 200 L (26.8 ± 0.1 °C), obteniéndose muestras de 6 ml de embriones de 10 HPF (~422 embriones) y empacados en tubos plásticos de 13 ml en proporción 1:1 con el diluyente. El tiempo de equilibrio se realizó durante 10 minutos en cava refrigerada a 6.2 °C e inmediatamente llevados a conservación durante 1 hora en un congelador a -14 °C. La descongelación se realizó en baño de agua a 27 °C durante 12 minutos. La incubación se desarrolló en incubadoras experimentales de 2 L (26.8 ± 0.1 °C) evaluando cada hora la viabilidad embrionaria hasta la eclosión, mediante muestras (~30 embriones) tomadas con varilla de vidrio. Embriones sin tratamiento fueron considerados como control. El tratamiento DMSO 12 – 17% (crioprotector-glucosa, respectivamente) presentó la mejor viabilidad embrionaria (93.3 ± 6.1%), mientras que el tratamiento MET 12 – 17% reflejó el mayor porcentaje de eclosión (92.76 ± 4.5%). De otro lado, el tratamiento DMA 20 – 10% presentó la menor viabilidad embrionaria (23.8 ± 6.5%) sin observarse eclosión. En conclusión, embriones de *P. brachyomus* de 10 HPF, conservados con DMSO 12 – 17% o MET 12 – 17%, durante 1 hora a -14 °C, reflejan porcentajes de viabilidad embrionaria y eclosión satisfactorios, sirviendo como base para establecer protocolos de conservación a -196 °C.

Palabras clave: conservación, eclosión, peces tropicales, viabilidad embrionaria.

Key words: conservation, embryo viability, hatching, tropical fish.

Efecto de los antioxidantes y el sistema de empaque sobre las características del semen porcino criopreservado

Effect of antioxidants and packaging system on the characteristics of cryopreserved boar semen

Andrés Pareja López¹, Zoot, MSc Biotecnología; Valentina Vélez Henao¹, Est Biología

¹Institución: Grupo de Investigación: Biología CES-EIA, Programa de Biología, Universidad CES, Medellín-Colombia.

El objetivo fue evaluar el efecto de la suplementación con antioxidantes y el tamaño de pajilla sobre las características de semen porcino criopreservado. Se evaluaron dos antioxidantes quercetina 25 µM y α-tocoferol 25 µM y dos sistemas de empaque, pajillas de 0.25 ml y 0.5 ml. Se utilizaron 15 reproductores entre 1 y 3 años de edad con mínimo 70% de espermatozoides móviles y 80% de espermatozoides normales. Los procedimientos de descenso de temperatura y congelación se realizaron de acuerdo al protocolo propuesto por Peña *et al.* (2003). Se usó un diseño de bloques completos al azar y el efecto del reproductor como factor de bloqueo. Se evaluó la movilidad mediante la visualización en microscopio de contraste de fases, funcionalidad e integridad de la membrana plasmática mediante tinción con eosina-nigrosina y test hipo-osmótico, respectivamente, la funcionalidad de membrana mitocondrial mediante tinción JC-1 y daño en ADN mediante ensayo cometa. Los datos se analizaron mediante una ANAVA y una comparación de medias (Fisher). Se encontró un mayor movilidad en el tratamiento con quercetina que con α-tocoferol y el control respectivamente (p<0.05). El tamaño de la pajilla influyó positivamente en estas variables siendo mucho mejor el empacado en 0.25 ml que en 0.5 ml, (p<0.05). Tanto la integridad, como la funcionalidad de la membrana plasmática mostraron mejor comportamiento en los tratamientos con antioxidantes respecto al control, pero el tamaño de la pajilla no tuvo un efecto significativo sobre estas variables. La funcionalidad de la membrana mitocondrial fue mayor para el α-tocoferol tanto en pajillas de 0.25 ml como en pajillas de 0.5 ml, que para el tratamiento con quercetina y el control, (p<0.05). No se encontró diferencia estadística significativa (p>0.05) para la variable daño en ADN entre los tratamientos con antioxidantes y entre los dos tipos de pajillas, pero se observó una alta variabilidad entre reproductores para esta y las demás variables evaluadas lo que sugiere que se debe establecer un sistema de selección en los programas de criopreservación de semen porcino para criodano. La suplementación con antioxidantes y el empaque del semen en pajillas de 0.25 ml tienen un efecto positivo sobre las características de semen porcino criopreservado.

Palabras clave: biotecnología, espermatozoides, porcicultura, reproducción.

Key words: biotechnology, porciculture, reproduction, spermatozoa.

Efecto de los sistemas de empaque abierto y cerrado y diferentes crioprotectores sobre las características de semen porcino criopreservado

Effect of open and closed packaging systems and different cryoprotectants on the characteristics of cryopreserved boar semen

Andrés Pareja López¹, Zoot, MSc; Valentina Vélez Henao¹, Est; Omar Camargo Rodríguez², MVZ, MSc, PhD.

¹ Grupo de Investigación: Biología CES-EIA, Programa de Biología, Universidad CES, Medellín – Colombia. ² Grupo de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de diferentes crioprotectores y los sistemas de empaque abierto y cerrado sobre las características del semen porcino criopreservado. Se utilizaron reproductores entre 1 y 3 años de edad con mínimo 70% de espermatozoides móviles y 80% de espermatozoides normales. Los procedimientos para el descenso de temperatura y congelación se realizaron de acuerdo al protocolo propuesto por Peña *et al.* 2003. Se evaluaron tres crioprotectores: glicerol 3%, dimetil sulfóxido 5% (DMSO) y dimetil formamida 5% (DMFA) y dos sistemas de empaque, pajillas de 0.25 ml y gotas abiertas. El diseño experimental utilizado es bloques completos al azar donde se utiliza el efecto del reproductor como factor de bloqueo. Los resultados preliminares muestran que para el sistema de empaque en pajillas hay un mayor porcentaje de espermatozoides móviles para el tratamiento con glicerol (40%) y DMF (30%) que para el

DMSO (5%) y con una calidad del movimiento de 3.5, 3 y 4, respectivamente (en una escala de 1 - 5 siendo 1 la peor y 5 la mejor). Para el sistema gotas abiertas se encontró un porcentaje de espermatozoides móviles para el glicerol (45%), DMFA (40%) y DMSO (30%) y una calidad del movimiento de 3.5, 3.5 y 4, respectivamente. Los resultados preliminares dilucidan que hay un efecto importante relacionado tanto con el crioprotector y el sistema de empaque sobre estas características espermáticas, lo cual puede representar una oportunidad de implementar un sistema relativamente rápido, sencillo y económico para la criopreservación de semen porcino y un sistema de fácil implementación en granjas porcícolas comerciales. Queda pendientes las evaluaciones a nivel de integridad (tinción con colorante vital eosina-nigrosina) y funcionalidad de la membrana plasmática (test hipoosmótico HOST), funcionalidad de la membrana mitocondrial (JC-1) e integridad del ADN (mediante la técnica de ensayo cometa), para completar la evaluación de estas variables en este trabajo.

Palabras clave: biotecnología, espermatozoides, porcicultura, reproducción.
Key words: biotechnology, porciculture, reproduction, spermatozoa.

Efecto de un biopreparado con características probióticas sobre los parámetros productivos la nutrición avícola

Effect of biopreparado with probiotic characteristics on the productive performance of poultry nutrition

Cecilia Lara Mantilla¹, Química, MSc, PhD; Julio Miguel Vargas Osorio¹, MVZ, (c)MSc

¹Universidad de Córdoba, Colombia. Laboratorio de investigación en Biotecnología. GRUBIODEQ.

La alta dependencia de la industria avícola por granos y otros ingredientes normalmente utilizados por el hombre, genera competencia entre la industria alimentaria y la industria de balanceados, incrementado el valor de éstos insumos y afectando la rentabilidad de las granjas avícolas. Por lo anterior se hace necesario la búsqueda de opciones económicas que permitan mejorar la eficiencia en la conversión de los alimentos para pollos favoreciendo la producción. En la presente investigación, se evaluó el efecto de un biopreparado líquido, sobre los parámetros de producción de pollos de engorde; el biopreparado se obtuvo a partir de contenido ruminal, cáscaras de frutas y diferentes concentraciones de una levadura nativa con características probióticas y fue suministrado en bebederos; alimentación rutinaria. El ensayo se realizó en una granja comercial, (Planeta rica, Córdoba), utilizando pollos (machos) línea comercial Cobb de un día de edad, distribuidos en cuatro tratamientos, completamente al azar: T₀ testigo, T₁: biopreparado de inóculo 10⁵ UFC, T₂: biopreparado de inóculo 10⁶ UFC, y T₃: biopreparado de inóculo 10⁸ UFC. El suministro de los tratamientos se realizó día por medio desde el día 4 de vida hasta el sacrificio. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y 38 aves por repetición para un total de 456 aves. Los indicadores peso corporal (p=0.0139), ganancia de peso (p= 0.0147), conversión alimenticia (p=0.0064) y mortalidad sólo presentaron diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) desde el día 18 al 25; el biopreparado logró disminuir la mortalidad en los lotes tratados (1.7%) frente al testigo (2.6%), además evitar la aplicación de ciprofloxacina, debido a que no se presentó estrés luego de la vacunación contra Gumboro. Aunque en la mayoría de los pesajes no hubo diferencias estadísticamente significativas, si tenemos en cuenta que esta industria es sensible económicamente y su producción es en volúmenes elevados, se consideran aspectos positivos como la ganancia vida del tratamiento 3 (T₃) que al situarse 300 gamos por encima del lote testigo, genera una alternativa importante para mejorar la productividad de las granjas avícolas. El biopreparado mejoró el estatus sanitario de los lotes tratados al disminuir la mortalidad y evitar el estrés post vacunal.

Palabras clave: biopreparado probiótico, ganancia en peso, pollos de engorde.

Keywords: biopreparado probiótic, chickens of fattening, gain in weight.

Efecto del crioprotector Dimetilformamida sobre la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*

*Effect of the Dimetilformamida crioprotector on the viability of *in vitro* produced bovine embryos*

Jorge Gómez Oquendo¹, MV; Neil Vásquez Araque², Biol, MSc, (c)Dr Sc; Benjamín Alberto Rojano², Qco, MSc, DrSc; John Jairo Giraldo Giraldo³, Zoot, Esp, (c)MSc.

¹Profesor Titular, Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, ²Profesor Asociado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, ³Docente Investigador, Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Corporación Universitaria Lasallista, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.

La vitrificación de embriones es un método, con curvas de enfriamiento superiores a las del congelamiento, que permite la reducción del tiempo de exposición del embrión en los puntos críticos de temperatura, disminuyendo así los daños térmicos y mecánicos causados durante la formación de hielo y aumentando la viabilidad de los embriones posterior a su criopreservación. Para evaluar el efecto del crioprotector Dimetilformamida (DF) sobre la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*, se trabajó un diseño de bloques completo al azar, en donde los embriones producidos fueron criopreservados bajo la técnica de vitrificación de pajilla abierta y estirada (Open Pulled Straw OPS) y fueron divididos en tres grupos así: Grupo 1 embriones no vitrificados, Grupo 2: Control embriones vitrificados en soluciones al 10% y al 20% de etilenglicol EG + dimetilsulfóxido DMSO, Grupo 3: T1 embriones vitrificados en soluciones al 7,5% y 15% de dimetilformamida DF + dimetilsulfóxido DMSO; T2 embriones vitrificados en soluciones al 10% y 20% de dimetilformamida DF + dimetilsulfóxido DMSO. Se realizaron diez repeticiones de cada grupo experimental. Los embriones se devitrificaron en medio TCM-199 Hepes con 20% de SFB y 0.25 M de sucrosa, luego fueron transferidos a gotas de medio TCM-199 Hepes con 20% de SFB y 0.15 M de sucrosa y finalmente fueron cultivados en medio EVOLVE con 5% de SFB, 0.33 mM de piruvato de sodio y solución antibiótica a 38.5 °C. Se evaluó la criotolerancia observando la reexpansión del embrión a las 6 y 18 horas pos devitrificación. Al realizar la evaluación de reexpansión a las 18 horas, se determinó en los embriones la peroxidación lipídica por decaimiento del cis-ácido parinárico y la producción de especies reactivas de oxígeno por diclorofluoresceína-diacetato. Al comparar el porcentaje promedio de reexpansión a las 18 horas mediante la prueba Tukey, el grupo T2 (91.6%) presentó los valores más altos (p<0.05) que en los demás grupos (T1 83.3%; TC 63.8%), demostrando que la inclusión de la dimetilformamida DF en la composición de la solución crioprotectora, puede tener un efecto benéfico en la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*.

Palabras clave: especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica, vitrificación.

Key words: free radicals, lipid peroxidation, vitrification.

Efecto del número de embriones transferidos, soporte de fase lútea con GnRH y crioprotector sobre las tasas de preñez en buvillas (*Bubalus bubalis*)

*Effects of embryo transfer number, luteal phase support with GnRH and cryoprotectant on pregnancy rates in water buffalo heifers (*Bubalus bubalis*)*

Jesús Alfredo Berdugo Gutiérrez¹, Médico Veterinario, MSc; John Fredy Ramírez Agudelo¹, Zoot

¹Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria (GINVER), Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela de Ciencias de la salud, Corporación Universitaria Remington, Edificio Remington, Calle 51 # 51-27, Parque de Berrío Medellín.

La transferencia de embriones es una técnica ampliamente utilizada en vacunos, pero su uso es reducido en búfalas; debido, fundamentalmente, a la dificultad de obtener embriones en forma convencional y al poco conocimiento existente sobre el manejo y optimización de esta técnica cuando se utilizan embriones producidos *in vitro*; por esto, se hace necesario evaluar diferentes aspectos asociados al éxito de esta estrategia reproductiva en búfalas. Con el propósito de contribuir a dicho conocimiento, se realizó un protocolo para determinar el efecto de algunas variables sobre las tasas de preñez transfiriendo

embriones a buvillas. Durante la estación reproductiva (Sept-Nov) de 2010, en el departamento de Córdoba, Colombia; se sincronizaron y transfirieron 40 buvillas en un protocolo para transferencia de embriones a tiempo fijo con Progestágenos, GnRH y PGF2 α (CIDR-synch). Se utilizaron embriones obtenidos *in vitro*. Se evaluaron tres variables: Embriones congelados en etilenglicol y glicerol (85 % y 15 %, respectivamente), transferencia de uno o dos embriones por buvilla (40% y 60%, respectivamente) y suplementación con GnRH al momento de la transferencia (62.5%). Para determinar el efecto de las variables independientes sobre la variable dependiente se realizó regresión logística binomial. 30 días después de la transferencia se realizó diagnóstico de preñez con ecografía y a los 60 días fueron confirmadas por palpación rectal. Las buvillas tenían un peso de 401 \pm 37 kg, edad 24 a 27 meses. Se transfirieron 64 embriones en 40 buvillas (1.6 embriones/hembra). Se obtuvo una tasa de preñez de 27.5% (11 preñeces, en igual número de animales). No se observó diferencia significativa en las tasas de preñez al transferir dos embriones, suplementar con GnRH o utilizar distintos tipos de crioprotector ($p > 0.05$). Los resultados obtenidos indican que los embriones de búfalo soportan la congelación en etilenglicol para transferencia directa. Las tasas de preñez obtenidas son comparables con las reportadas por otros investigadores en el mundo, y demuestran que los esquemas hormonales utilizados sirven como soporte de la fase lútea para el preñamiento de los embriones en esta especie. Se recomienda realizar este tipo de ensayos con un número mayor de animales.

Palabras clave: búfalo de agua, congelación, fase lútea transferencia de embriones.

Key words: embryo transfer, freezing, luteal phase, water buffalo.

Efecto del procedimiento de lavado uterino en las tasas de recuperación de embriones en ganado lechero superovulado

Effect of flushing procedures on embryo recovery rates in superovulated dairy cattle

Orlando Ramírez-Garzón¹, MV, MSc; Wouter Hazeleger², Ir, MSc, PhD

¹Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, UDCA. Facultad de Ciencias Pecuarias. Bogotá, Colombia. ²Wageningen University, Dept of Animal Science, P.O.

El objetivo del estudio fue a) evaluar el efecto en el número de lavados uterinos b) el movimiento (Experimento 1) y c) el aumento del volumen de lavado (Experimento 2) en las tasas de recuperación de embriones en vacas superovuladas. Las donadoras para el experimento 1 (n=40) y 2 (n=40) eran novillas (11-15 meses) y vacas primerizas no lactantes (30-60 meses) Holstein Friesian (Terwispel, Holanda). A los siete días después de la inseminación artificial, los embriones fueron recuperados con el procedimiento tradicional de lavado uterino (500 ml PBS/cuerno; control). En el Experimento 1, después de finalizar el lavado uterino tradicional, se dejó un volumen de 150 - 200 ml de PBS en el cuerpo del útero por 30 min. A un grupo de donadoras seleccionadas al azar se les permitió el desplazamiento (n= 15/40; MOV) y a otras se les restringió el movimiento (n=25/40; NoMOV) durante este periodo. A las 24 hrs, donadoras seleccionadas al azar (n=14/40) recibieron un tercer lavado. En el Experimento 2, cada cuerno uterino fue lavado con un litro de PBS en lugar de los 500 ml normalmente utilizados. Se realizó una prueba T-test para comparación de tratamientos. En el Experimento 1, el promedio de embriones recuperados fue 5.4 \pm 0.4. El 92.5% de los embriones se recuperaron durante el procedimiento tradicional y 7.5% durante el segundo lavado. Permitir (MOV) o restringir el movimiento (NoMOV) durante el segundo lavado tuvo un efecto significativo en los embriones extra recuperados (0.8 \pm 0.2 MOV Vs. 0.2 \pm 0.1 NoMOV, $p < 0.05$). Al realizar los tres lavados, el promedio de embriones recuperados fue 4.9 \pm 0.6. El 89.7% de los embriones se recuperaron durante el procedimiento tradicional, 6.1% en el segundo lavado a los 30 min (NoMov) y 4.2% a las 24 hrs. En el Experimento 2, el promedio de embriones recuperados fue 6.6 \pm 0.4. El 83.4% de los embriones fueron recuperados durante los 500 ml iniciales de lavado y el 16.6% fueron recuperados con los 500 ml extra de lavado. Los resultados muestran que realizar un segundo/tercer lavado con movimiento así como el incrementar el volumen de lavado por cuerno aumenta el número de embriones recuperados en donadoras superovuladas.

Palabras clave: bovinos, embrión, lavado uterino, superovulación.

Key words: bovine, embryo yield, superovulation, uterine flushing.

Efecto del uso de alfa tocoferol en la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* por método de pajilla abierta y estirada (OPS)

*Effect of the use of alpha tocopherol in the vitrification of bovine embryos produced *in vitro* method for open pulled straw (OPS)*

Diego Fernando Carrillo González¹, MVZ, (c)MSc; Neil Aldrin Vásquez Araque², Biol, MSc, (c)Dr.

¹Universidad de Antioquia, Escuela de Medicina Veterinaria, Grupo Biotecnología Animal. ²Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Grupo Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias.

Los embriones bovinos producidos *in vitro*, difieren de sus homólogos *in vivo* en muchos aspectos, entre ellos la resistencia para ser congelados, desarrollando técnicas y modelos de criopreservación de embriones, entre ellas la vitrificación. También se han modificado sistemas de cultivo *in vitro* buscando mejorar las condiciones ambientales en etapas tempranas del desarrollo embrionario, mejorando el porcentaje de supervivencia en procesos de criopreservación. Sin embargo, los protocolos hasta el día de hoy no son los mejores, lo que hace necesario realizar estudios que busquen mejorar la calidad de embriones bovinos producidos *in vitro* y sometidos a procesos de criopreservación. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del alfa tocoferol durante la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* en pajilla abierta y estirada (OPS) y evaluar la viabilidad de los embriones. Los embriones fueron suministrados por el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, se vitrificaron 11 embriones bajo concentraciones de Etilenglicol (7.5% y 16.5%) y Dimetil Sulfoxido (7.5% y 16.5%), en presencia de alfa-tocoferol y 10 embriones en ausencia de alfa tocoferol como tratamiento control. A las 24h posdesvitrificación, se determinó el porcentaje de reexpansión como parámetro indicativo de la viabilidad embrionaria mediante la observación bajo estereomicroscopio. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza utilizando el programa STATISTICA 10.0, resultado que permitió realizar un posterior análisis de comparación de medias entre los grupos utilizando la prueba de Tukey. El porcentaje de reexpansión fue diferentemente significativo ($p < 0.05$) para el tratamiento con alfa tocoferol (90.9%) comparado con el tratamiento control (60%). La vitrificación con OPS mejora los porcentajes de viabilidad embrionaria, debido a que el contacto de los embriones con la solución crioprotectora es directo y presenta una disminución del volumen de exposición de crioprotectores, que pueden llegar a generar efectos tóxicos sobre el embrión. El alfa tocoferol mejora el porcentaje de embriones reexpandidos, posdesvitrificación, reduciendo los daños en membrana de las blastómeras y manteniendo la integridad de la zona pelúcida, observándose una diferencia en porcentajes de eclosión. Se recomienda ampliar los estudios sobre el uso de alfa tocoferol en procesos de vitrificación.

Palabras clave: antioxidantes, criopreservación, reexpansión, viabilidad embrionaria.

Key words: antioxidants, cryopreservation, embryo viability, reexpansion.

Ensayos preliminares para la obtención de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) poliploides mediante la aplicación de choque térmico

*Preliminary tests for the production of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) polyploid by applying heat shock*

Carlos Mario Rivera Narváez^{1,2}, Ing Pesq, MSc; Jonathan Vergara Causil, Prof Acui²; Carlos Andrés Toro-Galvis^{1,2}, Zoot; Natalia Quintero Zuluaga¹, Zoot; Andrés Felipe Lopera Vásquez¹, Zoot; Liliana María Cardona Bermúdez^{1,2}, Zoot, MSc; Mónica Botero-Aguirre^{1,2}, Zoot, PhD.

¹Grupo GRICA, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia;

²Docente Escuela de Producción Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia

El mercado interno de la carne de trucha en Colombia ha presentado en los últimos años tendencia al incremento en la presentación de filete, de manera que ya no sólo se limita a la exportación. Para la producción de animales de 650 gr en promedio, se opta por el manejo de individuos triploides (3n) los cuales exhiben altas tasas de crecimiento comparados con los diploides (2n) una vez alcanzan la edad de la madurez sexual, ya que fisiológicamente no desarrollan las gónadas. En el país,

no se cuenta con paquetes tecnológicos para la producción de este tipo de individuos y con este trabajo que está en ejecución, se pretende realizar un acercamiento a las metodologías para obtener poblaciones triploides o tetraploides, esta última para ser utilizada como padrotes que garanticen una descendencia triploide al ser apareados con individuos diploides normales. Se llevó a cabo un diseño factorial con 3 factores correspondientes al momento de realización del choque térmico a 27 °C: 4, 9 y 17 minutos posfertilización y dos niveles correspondientes a la duración del choque de temperatura: 8 y 15 minutos. Las unidades experimentales constaron de 250 huevos de trucha arcoiris fertilizados a los cuales se les asignaron los tratamientos al azar, cada uno con cuatro repeticiones. Se determinarán el porcentaje de eclosión, porcentaje de sobrevivencia, porcentaje de individuos triploides y tetraploides por la técnica de conteo de Regiones Organizadoras de Nucléolos en núcleos interfásicos obtenidos a partir de suspensiones celulares de larvas sometidas al tratamiento. Se espera que con la utilización de choques térmicos en diferentes momentos posfertilización y de duración variable, se establezca un protocolo para la obtención de truchas poliploides bajo las condiciones locales de producción y así garantizar la demanda del país.

Palabras clave: larvas, temperatura, tetraploides, triploides.

Key words: larvae, temperature, tetraploid, triploid.

Evaluación de la adherencia de bacterias ácido lácticas al epitelio intestinal de pollos alimentados con probióticos

Evaluation of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal epithelium of chickens fed with probiotics

Luz Adriana Gutiérrez Ramírez¹, Biol, MS; Luz Adriana Ramírez Arias¹, Zoot, MSc.

¹Corporación Universitaria Lasallista

El consumo de probióticos genera una influencia positiva en la salud del hospedero; mejorando su productividad, la resistencias a patógenos y la conversión alimentaria entre otras. En este proyecto se buscó identificar y cuantificar por técnicas moleculares y microbiológicas, la adherencia de bacterias nativas con actividad probiótica suministradas en la dieta a pollos de engorde; para su ejecución se utilizaron 103 pollos divididos en tres lotes, un lote fue el control; el segundo se alimentó con concentrado sin antibióticos promotores de crecimiento y con las bacterias probióticas mas levaduras; el tercero se alimentó con concentrado sin promotores de crecimiento pero con probióticos comerciales (Prokura Poll-S®). Se sacrificó un pollo de cada lote en tres momentos (días 10, 20 y 42), se extrajo el ciego de cada uno y se diluyó hasta 10⁻² inoculándose 0.1 ml en agar MRS a 37 °C/anaeróticamente/72 horas; al cabo de este tiempo se determinó Unidades Formadoras de Colonias más identificación por Gram. Para la evaluación molecular se realizó extracción de ADN con kit QIAGEN y amplificación de la región 16s de ADNr por PCR, para identificar las bacterias adheridas. Se determinó que el conteo de UFC aumenta en el tiempo, encontrándose en el último recuento 352 UFC en el primer lote, el segundo 1604 UFC y el tercero 1260 UFC, correspondientes a *Lactobacillus*; y se obtuvo el ADN bacteriano pero la región de ADNr no amplificó. Se evidenció diferencias estadísticamente significativas (p<0.001) entre las UFC de los recuentos evaluados, sin embargo las especies bacterianas no se determinaron molecularmente porque necesitan técnicas más sensibles para su estudio.

Palabras clave: *Lactobacillus*, Levaduras, PCR, prebiótico.

Key words: *Lactobacillus*, PCR, probiotics, yeasts.

Evaluación de la calidad seminal de búfalos ganadores sometidos a pruebas de desempeño¹

Evaluation of the semen quality the of winner buffaloes submitted to performance test

Swammy Yamid Gutierrez Molina², Tec.Pec, Est Zoot; Carolina Mesa Pineda³, Zoot; Liliana Soto Márquez², Est Zoot; Diana María Bolívar Vergara^{2,4}, Zoot, (c) PhD, Mario Fernando Cerón-Muñoz^{2,3}, Zoot, PhD.

¹Proyecto: "Pruebas de desempeño en baby búfalo y búfalos doble propósito, en procura de seleccionar los mejores individuos para características relacionadas a la producción y rendimiento de carne" financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Asociación Colombiana de Criadores de Búfalos, Universidad de Antioquia, Corporación Universitaria Lasallista. ²Grupo de Investigación en Genética, Mejoramiento y Modelación Animal GaMMA, Facultad de Ciencias Agrarias e Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ³ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. ⁴Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, candidata a doctor de la Universidad de Antioquia y Fundación Universitaria San Martín.

La evaluación de la calidad espermática es una de las herramientas de análisis empleada en la selección de reproductores para el servicio de monta natural o inseminación artificial. En gran medida, de la calidad seminal depende que las hembras se preñen y por consiguiente sea óptima la reproducción del hato. Por tal motivo, se evaluó la calidad seminal de cinco búfalos reproductores sometidos a pruebas de desempeño. Se analizó información preliminar de 19 colectas de semen fresco y 19 de semen criopreservado (dosis de 0.5 mL) utilizando protocolos convencionales desarrollados por la empresa Reprovet R.v.E.u. Para semen fresco se analizaron las características: volumen (V), concentración (C), movilidad masal (MM) y en semen criopreservado: número de dosis por eyaculado (ND), movilidad individual (MID), millones de espermatozoides móviles (MSD), millones de espermatozoides móviles progresivos (MPD), concentración total (CTD). Se empleó un modelo lineal generalizado utilizando como efectos fijos fecha de colecta e identificación. También se realizaron correlaciones de Spearman entre las anteriores características. Las medias fueron 4.24 ± 1.68 (mL), 1.159 ± 215.60 (millones de espermatozoides/mL), 4.15 ± 0.89 (muy buena), 48.10 ± 22.27 (número de dosis), 59.42 ± 14.41 (%), 33.64 ± 8.57 (millones de espermatozoides/0.5mL), 12.60 ± 3.21 (millones de espermatozoides/0.5mL), 57.19 ± 9.82 (millones de espermatozoides/0.5mL). Existieron diferencias estadísticas significativas (p<0.05) para las variables V, MM y ND entre individuos. Se encontraron correlaciones positivas y significativas entre V y MM (0.62), V y ND (0.78), V y CTD (0.48), MM y ND (0.55), ND y CTD (0.47), MID y MSD (0.64), MID y MPD (0.67), MSD y MPD (0.56), MSD y CTD (0.48). Aunque son cinco búfalos evaluados preliminarmente, se tienen varias repeticiones del mismo individuo, aumentando la confiabilidad de los datos. Estos resultados suministran información de la calidad espermática del semen bufalino para ser implementado como herramienta biotecnológica.

Palabras clave: criopreservación, espermatozoides, inseminación artificial.

Key words: artificial insemination, cryopreservation, sperm.

Evaluación del estado redox y la capacidad antioxidante en diferentes diluyentes para la criopreservación de semen equino

Assessment of redox status and antioxidant capacity in different extenders for the cryopreservation of stallion semen

Giovanni Restrepo Betancur. Zoot, MV, MSc, cPhD²; Neil Aldrin Vásquez Araque. Biólogo, MSc, cPhD²; Benjamín Alberto Rojano. Química, MSc, PhD³.

¹Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, ²Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, ³Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

La criopreservación de semen es uno de los procedimientos más importantes en el desarrollo de biotecnologías para la reproducción equina, como son la inseminación artificial y la producción de embriones. Sin embargo, la escasa fertilidad del semen criopreservado para dicha especie, ha limitado de manera substancial su utilización. Se ha descrito que uno de los factores más relacionados con esta problemática, es el estrés oxidativo del semen, resultado entre otros factores del incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), a causa del choque térmico, la naturaleza química de los crioprotectores, y la

alteración de la disponibilidad y la funcionalidad de los antioxidantes endógenos. Para lograr la optimización de los procesos de criopreservación de semen equino se han empleado diferentes diluyentes suplementados con diversas moléculas nutritivas, crioprotectoras y antioxidantes. Sin embargo, se conoce muy poco sobre el estado redox y la capacidad antioxidante de dichos diluyentes, como aspectos relacionados con su contribución en la prevención del estrés oxidativo del semen equino criopreservado. El objetivo de este estudio es determinar el estado redox y la capacidad antioxidante de diferentes diluyentes utilizados para la criopreservación de semen equino. Para lo cual, se recolectará el semen de cinco equinos de la raza criollo colombiano, con frecuencia semanal, durante tres semanas. El semen fresco será evaluado y seleccionado según parámetros de fertilidad potencial (concentración, movilidad progresiva y morfología). Posteriormente, será diluido en dos diluyentes comerciales. Se determinará el estado redox y la capacidad antioxidante para ambos diluyentes en los tratamientos: 1. diluyente, 2. diluyente más plasma seminal, y 3. semen diluido, mediante las metodologías de fluoresceína diacetato (FDA), del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de descolocación con el radical catiónico ABTS. La evaluación estadística se realizará mediante análisis de regresión lineal. Como resultados parciales, se estableció un estado basal de ROS y peroxidación lipídica en ambos diluyentes, al igual que se observó mayor generación de ROS y peroxidación en el semen diluido, respecto al diluyente más plasma seminal. Se tiene como perspectiva reconocer el estado redox y la capacidad antioxidante de los diluyentes como aporte al mejoramiento de la criopreservación de semen equino.

Palabras clave: congelación, diluyente, especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica.

Key words: extender, freezing, lipid peroxidation, reactive oxygen species.

Evaluación del inhibidor de PDE4, YM976 sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos

Evaluation of PDE4 inhibitor, YM976 on in vitro production of bovine embryos

Diego Fernando Carrillo González¹, MVZ, (c)MSc; Pablo Andrés Gutiérrez², Biol, PhD; Neil Aldrin Vásquez Araque³, Biol, MSc, (c)Dr

¹ Universidad de Antioquia, Escuela de Medicina Veterinaria, Grupo Biotecnología Animal, ² Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Grupo Biotecnología Animal, ³ Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Grupo de Biotecnología Microbiana, Facultad de Ciencias, ⁴ Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Grupo Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias.

Un embrión de buena calidad depende de la competencia del oocito para reanudar la meiosis y la capacidad para el desarrollo después de la fertilización. En procesos de producción *in vitro* de embriones (PIVE), el oocito es aspirado de un folículo que no ha alcanzado su tamaño para ovular y es madurado en presencia de las gonadotropinas (FSH y LH). Se ha demostrado que los inhibidores de fosfodiesterasa tipo 4 (PDE4) pueden reemplazar la acción de las gonadotropinas durante el proceso de maduración *in vitro* de oocitos bovinos, sin embargo no se ha evaluado su competencia para el desarrollo embrionario. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del inhibidor de PDE4 YM976, en la producción *in vitro* de embriones bovinos. Para ello, se obtuvieron complejos de buena calidad según Nagano y col. 2006, a partir de ovarios de matadero y madurados *in vitro* durante 24h en medio TCM-199 suplementado con diferentes concentraciones de YM976 (1nM, 10nM, 100nM y 1000nM) o gonadotropinas. Posteriormente fueron fertilizados y cultivados medio de cultivo KSOM Evolve por 7 días, en condiciones de 5% de CO₂, 38.5 °C y 95% de humedad. A las 72 horas pos inseminación (hpi) se determinó el porcentaje de embriones clivados y 96 horas más tarde el porcentaje de embriones en estado de blastocisto. Al comparar el porcentaje de embriones clivados entre los grupos, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) 1nM (73.55%), 10nM (62.73%), 100nM (69%), 1000nM (50.3%) y gonadotropinas (72.7%). Sin embargo, los mejores porcentajes de embriones en etapa de blastocisto, fueron obtenidos con YM976 1nM (26,18%) y 10nM (22.96%), sin presentar diferencia estadística ($p > 0.05$) con el grupo madurado con gonadotropinas (21.03%). Estos resultados sugieren que los oocitos madurados *in vitro* en presencia del inhibidor YM976 1nM y 10nM, presentan una competencia para el desarrollo embrionario para alcanzar etapa de blastocisto, similar a la obtenida con gonadotropinas. Se concluye que el uso de inhibidores de PDE4 como el YM976 es una alternativa en la PIVE, sin embargo, se recomienda iniciar estudios bioquímicos y moleculares de calidad del oocito y del embrión.

Palabras clave: AMPc, clivaje, fosfodiesterasas tipo 4, maduración *in vitro*.

Key words: cAMP, cleavage, *in vitro* maturation, phosphodiesterase type 4.

Evaluación del surfactante SDS en semen porcino criopreservado

Evaluation of SDS surfactant on cryopreserved boar sperm

Valentina Vélez Henao¹, Est Biología; Andrés Pareja López¹, Zoot, MSc Biotecnología

¹ Grupo de investigación: Biología CES-EIA, Programa de Biología, Universidad CES, Medellín – Colombia

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del surfactante SDS (Sodio Dodecil Sulfato) sobre las características espermáticas del semen porcino congelado. Se evaluaron cuatro tratamientos: 0.15%, 0.30%, 0.45% SDS y 1.2% Equex STM (control). Se utilizaron 8 reproductores entre 1 y 3 años de edad con mínimo 70% de espermatozoides móviles y 80% de espermatozoides normales. El descenso de temperatura y congelación se realizaron de acuerdo al protocolo propuesto por Peña *et al.* (2003). Se usó un diseño de bloques completos al azar y el efecto del reproductor como factor de bloqueo. Se evaluó la movilidad mediante la visualización en microscopio de contraste de fases, funcionalidad e integridad de la membrana plasmática mediante tinción con eosina-nigrosina y test hipo-osmótico, respectivamente, la funcionalidad de membrana mitocondrial mediante tinción JC-1 y daño en ADN mediante ensayo cometa. Los datos se analizaron mediante una ANAVA y una comparación de medias (Fisher). Para la movilidad se encontró un menor porcentaje de espermatozoides móviles en el tratamiento 0.15% respecto al control ($p < 0.05$), los tratamientos 0.30% y 0.45% SDS no presentaron diferencia con el control, igualmente para la calidad de movimiento. Se encontró una menor funcionalidad e integridad de la membrana plasmática entre los tratamientos respecto al control ($p < 0.05$), igualmente para la actividad mitocondrial ($p < 0.05$). No se encontró daño en ADN entre los diferentes tratamientos, pero se determinó una alta variabilidad asociada a los reproductores para esta y las demás variables evaluadas. El SDS permite recuperar una cantidad considerable de espermatozoides móviles, pero se encontró que afecta tanto la membrana plasmática como la mitocondrial. Los resultados indican que el SDS no permite que los espermatozoides regulen adecuadamente su balance osmótico, posiblemente por la alteración de las proteínas transmembrana. Se observó que la movilidad no se afectó por el bajo potencial de membrana mitocondrial lo cual sugiere vías metabólicas alternas asociadas a la producción de energía para la movilidad espermática. La alta variabilidad asociada a los reproductores sugiere la necesidad de establecer un sistema de selección para resistencia al crio-daño en los programas de congelación de semen porcino.

Palabras clave: biotecnología, espermatozoides, porcicultura, reproducción.

Key words: biotechnology, porciculture, reproduction, spermatozoa.

Evaluación del YM976 en la maduración *in vitro* de oocitos bovinos

Evaluation of YM976 on in vitro maturation of bovine oocytes

Diego Fernando Carrillo González¹, MVZ, (c)MSc; Diana Milena Maturana², Est Ing. Biol; Pablo Andrés Gutiérrez³, Biol, PhD; Neil Aldrin Vásquez Araque⁴, Biol, MSc, (c)Dr

¹ Universidad de Antioquia, Escuela de Medicina Veterinaria, Grupo Biotecnología Animal, ² Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Grupo Biotecnología Animal, ³ Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Grupo de Biotecnología Microbiana, Facultad de Ciencias. ⁴ Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Grupo Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias.

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) ha permitido la investigación en los mecanismos de maduración nuclear y citoplasmática de oocitos bovinos, bajo estímulos con gonadotropinas u otros compuestos como inhibidores de fosfodiesterasas, con el fin de mejorar la calidad del oocito y su competencia para el desarrollo embrionario. Las fosfodiesterasas tipo 4 (PDE4) presentes en las células de la granulosa hidrolizan el AMPc que juega un papel importante en la maduración nuclear y la expansión de células de la granulosa. Los inhibidores específicos de PDE4 como el YM976, podrían permitir un aumento en las concentraciones de AMPc activando la cascada de señalización de la maduración del oocito, pero prolongando las uniones gap. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del inhibidor de PDE tipo 4, YM976, sobre el grado de expansión del Complejo Cumulo Oocito (CCO) bajo los criterios de Calder *et al.* (2003), y el porcentaje

de Metafase II por tinción con colorante Hoechst. Los CCO se obtuvieron por aspiración folicular, a partir de ovarios de la central ganadera de Medellín, seleccionando aquellos de buena calidad según Nagano *et al.* (2006) y madurados *in vitro* por 24h en medio TCM-199 suplementado con diferentes concentraciones de YM976 (1nM, 10nM, 100nM y 1000nM) o gonadotropinas (LH y FSH). El porcentaje de expansión grado 3 a las 24 h, fue del 81% para gonadotropinas con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al compararlo con las mejores concentraciones de YM976 1nM y 10nM (24.83% y 23.21%, respectivamente). El porcentaje de metafase II obtenido con gonadotropinas y YM976 10nM fue similar ($p > 0.05$) (79.62% y 88.33%, respectivamente), pero presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) al compararlo con YM976 1nM (60.39%). Se observó un retraso en la expansión de las granulosa en los grupos de YM976, comparado con las gonadotropinas, que podría permitir al oocito una mejor maduración citoplásmica mediante la prolongación de las uniones gap, durante la maduración *in vitro*. Se concluye que al utilizar el YM976 10 nM, como único estímulo en la maduración *in vitro* de oocitos bovinos, se retrasa la expansión de las células del cúmulo, sin afectar el porcentaje de maduración nuclear.

Palabras clave: expansión fosfodiesterasas, maduración *in vitro*, oocito.

Key words: expansion phosphodiesterases, maturation *in vitro*, oocyte.

Evaluación de bacterias ácido-lácticas con características probióticas en la alimentación de lechones en fase de precebo como alternativa al uso de antibióticos

Assessment lactic acid bacteria with probiotics characteristics in feed of stage pre-fatten piglets as an alternative to the use of antibiotics

Henry Jurado Gámez¹, Zoot, Esp, MSc, PhD; Cristina Ramírez Toro², Bióloga, MSc, PhD

¹Universidad de Nariño, Profesor Asociado, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootecnia. ²Universidad del Valle, Profesor Asociado, Escuela de Ingeniería de Alimentos.

Los probióticos benefician la salud del animal, mejorando su equilibrio microbiano intestinal, su conversión alimenticia, ganancia de peso vivo final y respuesta inmune. Constituyen una alternativa para tratar enfermedades, como diarrea. En este estudio se tomaron muestras del intestino grueso de 20 cerdos, aislándose dos microorganismos (*Lactobacillus plantarum*). El objetivo era aislar bacterias con características probióticas. Estos microorganismos inhibieron a *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens*. Las pruebas bioquímicas y molecular fueron compatibles con los *Lactobacillus*; siendo Catalasa negativas; no productoras de gas; productoras de isómeros DL; resistentes a sales biliares y pH de 3.5 a 38 °C. El HPLC, indicó que *L. plantarum* 1 H1 fue homofermentativa, y *L. plantarum* 1 H2 heterofermentativa. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana para *L. plantarum* 1 H1 presentó sensibilidad a tetraciclina, eritromicina, oxitetraciclina y cloranfenicol. *L. plantarum* 1 H2 fue resistente a ampicilina, vancomicina y aztreonam. Los sobrenadantes producidos por las dos bacterias presentaron acción inhibitoria a una concentración del 10% -25%. La selección del medio de cultivo 4 presentó valores de crecimiento de 3.0×10^{12} y de 6.0×10^{11} UFC/mL, con un pH de 4.21 y 4.07, producción de ácido láctico de 17.66 g/L y 13.16 g/L para *L. plantarum* 1 H1 y *L. plantarum* 1 H2, respectivamente. *L. plantarum* 1 H1 (T1) y *L. plantarum* 1 H2 (T2) adicionados en la ración de iniciación mostraron valores de: inmunoglobulina A 333 mg/100 mL y 300 mg/100 mL; polimorfonucleares neutrófilos 55% y 65%; colesterol total, 13.83 y 93.8 mg%; Nitrógeno Ureico en Sangre 7.83 y 8.76 mg% para T1 y T2, respectivamente. Se evidenció la adhesión de *Lb. plantarum* 1 en el intestino de los animales tratados. Los mejores pesos vivos finales de 28 kg y 29 kg y la mayor ganancia de peso final de 19.9 kg y 20.9 kg para T1 y T2, respectivamente; además, evitando la presencia de diarrea en los tratamientos T1 y T2 donde no se incluyó antibióticos. *L. plantarum* constituyó una alternativa importante para la sustitución de los antibióticos que se emplean en la alimentación de los lechones.

Palabras clave: biotecnología, *Lactobacillus plantarum*, salud.

Key words: biotechnology, health, *Lactobacillus plantarum*.

La amniocentesis en el diagnóstico prenatal del sexo en bovinos

The amniocentesis in bovine sex prenatal diagnosis

Francisco José Valencia Alaix¹, Zoot, MSc; Juan Bautista López Ortiz¹, Biol, MSc; Silvia Elena Naranjo Elorza¹, Zoot Est Maestría

¹GENTECH & C-Genera, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

La amniocentesis consiste en la colecta de líquido amniótico para monitorear el desarrollo fetal, esta fue reportada por primera vez en 1966 en humanos, desde entonces se ha convertido en un procedimiento muy frecuente en diagnóstico prenatal, incluso recientemente se ha reportado su aplicación en bovinos aunque sólo con fines experimentales. El objetivo del presente estudio es realizar una aproximación a la técnica de diagnóstico prenatal del sexo a través de ADN obtenido de líquido amniótico en bovinos Colombianos, con este fin, se realiza la amniocentesis a 9 hembras entre 2 y 6 meses de gestación, posteriormente se lleva a cabo la extracción de ADN y la amplificación por PCR para el gen SRY, se diagnosticarán como machos, los individuos que obtengan amplificación para este gen y su ausencia será diagnosticada como hembra. Los resultados alcanzados hasta el momento arrojan obtención de ADN y amplificación que denotan la presencia de las regiones de interés en el 100% de las muestras evaluadas.

Palabras clave: ADN, PCR, SRY.

Key words: DNA, PCR, SRY.

Masculinización de hembras en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) implementando bloqueadores del receptor de estrógenos e inhibidores de la aromatasa

Masculinization of female in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) implementing estrogens receptor blockers and aromatase inhibitors

Liliana María Cardona Bermúdez¹, Zoot, MSc; Esteban Arroyave¹, Ing Agrop; Juan Carlos Quintero², MV, MSc; James Betancur López^{1,2}, Zoot.

¹Asociación Colombiana de Acuicultores – ASOACUICOLA. ²Grupo Laboratorio de Medicina Genómica, Universidad SURCOLOMBIANA.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la implementación de inhibidores de la aromatasa (IAs) y un bloqueador del receptor estrógenos (BREs) de forma individual y combinados, a través del alimento; para la masculinización de hembras en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Se implementaron líneas monosexo hembras importadas de TROUT LODGE, la investigación tuvo lugar en dos granjas: Los Alpes a 2600 msnm y 12 ± 2 °C (A) y Óvalos a 2150 msnm y 15 ± 2 °C (B). El día 12 post eclosión (*dpe*) y finalizada la reabsorción del saco vitelino, se dio inicio a la alimentación exógena, con cada uno de los tratamientos experimentales, se realizaron tres replicas con 200 individuos/replica. Los IAs implementados fueron exemestano (exe) y letrozol (let) y, el BREs fue tamoxifen (tam). Los tratamientos empleados fueron: exe50 mg/kg (T1), let50 mg/kg (T2), tam100 mg/kg (T3), exe + tam50 mg/kg + 100 mg/kg (T4), let + tam50 mg/kg + 100 mg/kg (T5), 17 α metil testosterona 250 μ g/kg (Control +) (T6) y etanol (control -) (T7), los tratamientos se aplicaron en el alimento vehiculizado en etanol (99%) empleando 150 ml, el alimento empleado fue en presentación harina (52% PB) suministrado al 10% de la biomasa, por un periodo de 80 días (92 *dpe*). El día 110 *dpe*, los individuos se anestesiaron para proceder a la extracción y análisis de las gónadas. Se empleó un diseño factorial 7×2 , los datos fueron analizados en el software estadístico SAS v8.1. El tratamiento T6 (control +) presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con los tratamientos T3, T5, T7, pero no con los demás tratamientos, con un porcentaje de machos del $35.18 \pm 12.3\%$. T7 (control -) presentó diferencias significativas con los tratamientos T1, T4 y T7. Entre las nuevas alternativas el T4 presentó el mayor porcentaje de machos ($27.38 \pm 13.5\%$). El análisis por granja no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre A y B. Los resultados obtenidos con IAs y BREs, los muestran como una alternativa para masculinización de hembras, que requiere nuevas investigaciones para la optimización de dosis que permitan aumentar la proporción de machos.

Palabras clave: aromatasa, masculinización, receptor de estrógenos, reversión sexual.

Key words: aromatase, estrogens receptor, masculinization, sex reversed.

Polimorfismos de los genes leptina, calpaína, mioglobina y calpastatina en diez razas bovinas criollas mediante siete marcadores de Polimorfismo Nucleótido Simple (SNPs)

Polymorphisms of leptin, calpain, myoglobin and calpastatin genes in ten creole cattle breeds using Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Juliana Andrea Cuetia Londoño¹, Zoot, Est MSc; Andres Mauricio Posso Terranova¹, Biol, Est MSc; Manuel Fernando Ariza Botero¹, MV, MSc, PhD; Jaime Eduardo Muñoz Flórez¹, Ing Agro, PhD(c); Luz Ángela Álvarez Franco¹, Zoot, MSc, PhD.

¹Universidad Nacional de Colombia.

Colombia es considerado uno de los países más diversos en recursos zoogenéticos, posee diez razas bovinas criollas (*Bos taurus*) adaptadas, las cuales han demostrado un alto potencial genético en cuanto a resistencia a enfermedades, mejores rendimientos en canal y una mejor eficiencia alimenticia, entre otras. La falta de valoración y el desconocimiento de las bondades del Ganado Criollo Colombiano (GCC) han llevado a constante cruzamientos graduales de absorción hacia ganado cebuino o taurino, ocasionando disminución en las poblaciones puras e introgresión con razas foráneas. Una manera de aumentar el tamaño poblacional del GCC es conocer y demostrar que posee características favorables. La calidad de la carne constituye un importante factor de interés económico. Estudios realizados en los últimos años en el genoma bovino a nivel mundial, han identificado diversas mutaciones puntuales (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs) en los genes Calpaína, Calpastatina, Leptina y Mioglobina involucrados en procesos de calidad de carne. Estudios realizados en cinco razas criollas en el gen Leptina mostraron una alta frecuencia en el alelo T relacionado con el grado de marmóreo. Trabajos realizados mediante la técnica Warner Bratzler han demostrado la terneza de las muestras de carne de animales cebú cruzados con Romosinuano. Por la gran diversidad de ganados criollos y la importancia de su conservación, el objetivo del presente trabajo es estimar las frecuencias alélicas y genotípicas de diferentes SNPs en los genes Calpaína (CAPN1), Calpastatina (CAST), Leptina (LEP) y Mioglobina, para ser comparadas con la frecuencias de los ganados importados. Utilizando las técnicas moleculares PCR-RFLP y PCR-SSCP se han amplificado los SNPs CAPN 316, CAPN 530, CAPN 4751, CAPN 4753, WSUCAST y LEP en 300 muestras de ADN bovino del Banco de ADN del laboratorio de Genética de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. El análisis estadístico de los datos y la estimación de frecuencias alélicas se está realizando mediante los programas SAS y Arlequin. Se espera que los SNPs relacionados con los genes de calidad de carne presentes en el GCC presenten: alta variabilidad, alta proporción de alelos deseables y diferencias en las frecuencias entre las razas.

Palabras clave: *calidad de carne, PCR-RFLP, PCR-SSCP.*

Key words: *meat quality, PCR-RFLP, PCR-SSCP.*

Polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2 en el ganado criollo Hartón del Valle por PCR-RFLP y PCR-SBT*

BoLA-DRB3.2 gen polymorphism in Hartón del Valle creole breeds by PCR-RFLP and PCR-SBT

Darwin Yovanny Hernández Herrera¹, Zoot, MSc, Est PhD; Andrés Mauricio Posso Terranova¹, Biol, Est MSc; Javier Antonio Benavides¹, MVZ, MSc, Est PhD; Jaime Eduardo Muñoz Flórez¹, IA, Esp, Cand PhD; Guillermo Giovambattista², Biol, PhD; Luz Ángela Álvarez Franco¹, Zoot, MSc, PhD

* Financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

El complejo mayor de histocompatibilidad de los bovinos, conocido como BoLA (*Bovine Lymphocyte Antigen*) está formado por tres clases de genes con diferente función. Los genes clase II, distribuidos en las regiones IIa y IIb, codifican glicoproteínas que se unen a péptidos exógenos y son expresadas por células del sistema inmune. En la región IIa se encuentra el locus DRB con los loci DRB1, DRB2 y DRB3; el exón 2 del DRB3 (DRB3.2) es el más polimórfico y se ha asociado con características productivas y con resistencia a enfermedades, pero ha sido poco estudiado en el ganado criollo colombiano. El objetivo del presente

trabajo fue caracterizar el polimorfismo del gen BoLA-DRB3.2* en la raza Hartón del Valle (HV), mediante dos técnicas moleculares. En 99 muestras HV se comparó el genotipaje del gen BoLA-DRB3.2* mediante PCR semianidada-RFLP y secuenciación PCR-SBT (*Sequence Based Typing*). Se encontraron 37 alelos por SBT y 29 por RFLP. Los alelos más frecuentes con PCR-RFLP fueron *20 y *23 (0.117); *34 (0.102); *16 (0.086); *22 y *31 (0.056) y *15 (0.51). Para SBT los de mayor frecuencia fueron *1101 (0.204); *20012 (0.122) y *2006, *2801 (0.071), también se detectaron los alelos *YA30new (0.010) y *YA97sp3 (0.025), reportados recientemente en el ganado criollo de Bolivia. La heterocigocidad esperada (He) fue mayor que la observada (Ho) con ambas metodologías, sin embargo, He fue mayor por PCR-RFLP que por PCR-SBT (0.924 y 0.734, respectivamente) y Ho fue similar en ambos casos. La muestra se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.001$) con ambas metodologías. El F_{IS} que no fue significativo con PCR-RFLP (0.0129 $p > 0.05$) fue altamente significativo con SBT (0.2133, $p < 0.001$). El porcentaje de variación entre individuos por SBT fue 21.33% y 1.29% por RFLP. Los resultados muestran alta diversidad para este gen en el HV; la genotipificación por PCR-SBT puede detectar mayor variación entre individuos que PCR-RFLP.

Palabras clave: *complejo mayor de histocompatibilidad, marcadores moleculares, variación genética.*

Key words: *histocompatibility complex, molecular markers, genetic variation.*

Producción de supermachos. I. Normalización de una técnica para la determinación del genotipo sexual de tilapia roja (*Oreochromis spp*) por cariotipo. Muestreo y obtención de las preparaciones cromosómicas

*Supermales production. I. Standardization of a technique for determining the genotype of red tilapia (*Oreochromis spp*) by karyotype. Sampling and obtaining chromosome preparations.*

Mónica Botero-Aguirre¹, Zoot, PhD; Carlos A López-Escudero¹, Zoot, cDSc; Francisco José Valencia Alaix², MSc.

¹Universidad de Antioquia. Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias – GRICA. Medellín, Colombia. ²Investigador independiente.

En peces la toma de sangre puede hacerse en varios puntos específicos, por punción cardiaca, de aorta dorsal o de vena caudal entre otras, dependiendo de las necesidades y el estado del pez. Las muestras de 20 ejemplares de este trabajo se tomaron de vena caudal, usando heparina como anticoagulante, obteniéndose volúmenes entre 0.9 y 1.9 ml, usando el siguiente protocolo, previa desinfección de la superficie de trabajo: se impregnaron las paredes de la jeringa con heparina sódica, cambiando previamente la aguja se tomó la muestra de sangre del pez punzando entre la línea lateral y la base de la aleta anal con rapidez para devolver lo más pronto posible el ejemplar al agua. La siembra para cultivo celular siguió los requisitos de bioseguridad y asepsia, los implementos fueron esterilizados. Para el montaje del cultivo se mezclaron 4 ml de medio de cultivo HAM F12 (Sigma-Aldrich) con 0.5 ml de Suero Fetal Bovino SFB y 0.7 ml de Fitoheamaglutinina al 0.5%. Las características fisicoquímicas del medio determinarán el éxito del cultivo. Los frascos se llevaron a la incubadora a 28°C por 96 horas. Una hora antes de cumplido este tiempo se agregó 100 µl de Colcemid. Posteriormente se adicionó a cada frasco 10 ml de KCl, se pasó el contenido de los frascos a tubos cónicos y se centrifugó a 5000 rpm por 8 minutos. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron por goteo y en vórtex, 6 ml de solución carnoy (metanol 3:1 acético), se centrifugó a 5000 rpm por 7 minutos, luego de retirar el sobrenadante se adicionaron de la misma forma, 4 ml de solución carnoy, centrifugando por 4 minutos a las mismas revoluciones; se retiró el sobrenadante y finalmente se agregaron 2 ml de solución carnoy, centrifugando y retirando el sobrenadante, dejando 1 ml de solución carnoy. Los extendidos cromosómicos se logran por goteo en portaobjetos fríos, mantenidos en agua destilada con hielo, previo pregoteo con solución carnoy; se observaron las placas al microscopio a 40x, obteniéndose 80 preparaciones cromosómicas de buena calidad en las 10 placas analizadas.

Palabras clave: *cariotipo, genotipo, supermachos, tilapia.*

Key words: *genotype, karyotype, supermales, tilapia.*

Producción de supermachos. II. Estandarización de una técnica de extracción de ADN de tilapia roja (*Oreochromis spp*) para determinación de genotipo sexual por pruebas moleculares

Supermales production. II. Standardization of a technique for extracting DNA from red tilapia (*Oreochromis spp*) for determination of sexual genotype by molecular testing

Mónica Botero-Aguirre¹, Zoot, PhD; Carlos López Escudero A¹, Zoot, (c) DSc; Francisco José Valencia Alaix², MSc.

¹Universidad de Antioquia. Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias – GRICA. Medellín, Colombia. ²Investigador independiente.

Un apropiado método de muestreo de tejidos como aletas, escamas o bien de sangre, es primordial en estudios que emplean la reacción en cadena de la polimerasa, sin embargo, la extracción de ADN es crítica en dichos trabajos. Exploradas las opciones de muestreo en peces, se optó por sangrar 20 ejemplares entre 50 y 100 gr, tomando las muestras con jeringa y papel filtro, generando estrés a cambio de opciones altamente invasivas que ponen en riesgo la vida de los ejemplares. Los volúmenes obtenidos estuvieron entre 0.9 hasta 1.9 ml. En este trabajo enmarcado dentro del proyecto de producción de supermachos se realizaron múltiples extracciones con kit comercial, haciendo algunas modificaciones y verificando posteriormente por medio de electroforesis horizontal en gel de agarosa, definiendo como protocolo el siguiente: En un tubo para microcentrifuga se adicionan 20 µl de proteínaasa K, 10 µl de sangre con anticoagulante y 190 µl de PBS. Se adicionan 200 µl de buffer AL. Se lleva a vórtex por 10 segundos y se incuba 56 °C por 10 minutos. Se agregan 200 µl de etanol (96-100%) y se lleva al vórtex por 15 segundos. La mezcla se pasa a la minicolumna introducida en un tubo de 2 ml y se centrifuga a 8000 rpm por 1 minuto. Se descarta el tubo con su contenido. Se pone la columna en un nuevo tubo de 2 ml, se adicionan 500 µl de buffer AW1 y se centrifuga nuevamente a 8000 rpm por 1 minuto. Descartando nuevamente el tubo y colocando la minicolumna en uno nuevo, se adicionan 500 µl de buffer AW2, centrifugando a 14000 rpm por 3 minutos. Se descarta el tubo. Se adicionan 100 µl de agua estéril en la membrana de la minicolumna colocada en un nuevo tubo. Se centrifuga a 8000 rpm por 1 minuto. Se descarta la minicolumna, el contenido del tubo es el resultado de la extracción. Luego de la electroforesis se confirmó en el transiluminador, la obtención de ADN en buena cantidad, por medio de este protocolo que evita el sacrificio de los ejemplares y en parte el bienestar de los mismos.

Palabras Clave: bienestar, calidad, extracción, muestras.

Key words: extraction, quality, samples, wellness.

Uso de la RT-PCR para la evaluación de la viabilidad de oocitos bovinos en la producción de embriones *in vitro*

RT-PCR assessment for the bovine oocytes viability *in vitro* embryo production

Susana Posada Céspedes, Est Ing Biológica; Neil Vásquez Araque¹ Biol, MSc, (c) Dr; Pablo Gutiérrez², PhD

Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, ¹Profesor asociado, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín Laboratorio Biotecnología Anima, ²Profesor asociado, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Escuela de Biociencias, Laboratorio microbiología industrial

El estudio de la expresión de genes de fosfodiesterasa en el oocito y células de la granulosa, ha permitido el planteamiento de estrategias de modulación de la maduración del oocito. Así mismo, factores asociados a la competencia del oocito para el desarrollo embrionario pueden ser estudiados mediante el análisis transcripcional de marcadores genéticos como *survivalina* y *ju-1*. Las fosfodiesterasas (PDE) son una familia de proteínas, unas de ellas implicadas en la regulación de los niveles de AMPc en el oocitos y las células de la granulosa durante el proceso de maduración. La expresión específica de esta proteína en la unidad folicular, en donde la PDE3 se expresa en el oocito y la PDE4 en las células del cúmulo, permite el diseño específico de inhibidores para modular las concentraciones del AMPc en estos compartimentos celulares. Sin embargo, no se conocen las isoformas de las enzimas PDE de la unidad folicular bovina. De otro lado, la detección de RNAm correspondiente a genes asociados a la fertilidad, como son la *survivalina*, relacionado con viabilidad y proliferación celular y el *ju-1*, específico

del oocito y fundamental para el desarrollo embrionario preimplantatorio, es de gran interés para la estandarización de protocolos que implementen su empleo como marcadores genéticos. En este trabajo se estandarizó la técnica de RT-PCR como una herramienta para la evaluación de los transcritos de fosfodiesterasa, *ju-1* y *survivalina*. El RNA fue obtenido a partir de lisados celulares de células de la granulosa y oocitos bovinos madurados *in vitro*. Dicho material genético fue evaluado para los dos grupos celulares por separado. Se evaluaron diferentes protocolos de remoción de la zona pelúcida utilizando concentraciones variables de pronasa. Como control positivo de la RT-PCR se utilizó el gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*). Los cebadores para *survivalina*, *ju-1* y *gapdh* fueron obtenidos a partir de la literatura. Los cebadores para fosfodiesterasa, *pde3* y *pde4*, fueron diseñados por los autores. Como control de amplificación se utilizó DNA genómico bovino utilizando los mismos cebadores. Para determinar el efecto de la degradación de las colas poly(A) se generó cDNA con cebadores oligo(dT) y hexanucleótidos. Los resultados de esta investigación serán utilizados como un parámetro molecular para la evaluación de oocitos en una etapa previa al proceso de producción de embriones *in vitro*.

Palabras clave: cDNA, fosfodiesterasa, *gapdh*, *ju-1*, RNAm, *survivalina*.

Key words: cDNA, *gapdh*, *ju-1*, mRNA, phosphodiesterase, *surviving*.

Validación de dos metodologías para la obtención de neomachos en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Validation of two methods for obtaining female sex reversal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

James Betancur López^{1,2}, Zoot; Esteban Arroyave¹, Ing Agrop; Liliana María Cardona Bermúdez¹, Zoot, MSc

¹Asociación Colombiana de Acuicultores – ASOACUCOLA, ²Grupo Laboratorio de Medicina Genómica, Universidad SURCOLOMBIANA.

El objetivo del presente estudio fue validar dos metodologías para la producción de neomachos en Colombia, comparando los resultados de ambas metodologías en dos centros de reproducción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el departamento de Antioquia: Los Alpes a 2600 msnm y 12 ± 2 °C en el agua (A) y Óvalos a 2150 m.s.n.m y 15 ± 2 °C (B). Se implementaron ovas embrionadas monosexo hembras importadas de TROUT LODGE inc. El día 7 post eclosión, a un grupo de larvas se les realizó una inmersión de 2 horas en 17 α metiltestosterona (MT) 400 µg/lt (T1) y como testigo se empleó 2.1 ml de etanol 99% (T2), la misma cantidad se usó para vehicular la hormona, para una concentración final de 0.01%, la inmersión se llevo a cabo en acuarios, con un volumen de 21 litros y un sistema cerrado de recirculación continuo incorporado. Finalizado el periodo de exposición, las larvas fueron transferidas a canaletas con agua libre de compuestos. Por otro lado, un grupo de larvas de 12 *dpe*, con reabsorción del saco vitelino completa, inició alimentación exógena con 17 α metiltestosterona 250 µg/kg (T3) y como testigo se empleó alimento con 150 ml de etanol (T4), con igual cantidad se disolvió la hormona en el alimento para T3, el alimento empleado fue presentación en harina (52% PB), suministrado al 10% de la biomasa, por un periodo de 80 días (92 *dpe*), el mismo plan de alimentación, pero sin tratar fue suministrado a los individuos de la inmersión. Para cada uno de los tratamientos experimentales, se realizaron tres replicas con 200 larvas/replica. El día 110 *dpe*, los individuos fueron anestesiados para proceder a la extracción y análisis histológico de las gónadas. Se empleó un diseño factorial 4 x 2, los datos fueron analizados en el software estadístico SAS v8.1. El tratamiento T3 (250ug MT/kg), presentó diferencias significativas (p<0.05) con los demás tratamientos, el valor de masculinización fue 35.18 ± 12.39%. T1 (400 ug MT/lt) presentó diferencias significativas con T1, T2 y T4; el porcentaje de machos fue 18.3 ± 7.52%. El tratamiento con 250ug MT/kg (T3) resulta ser el sistema más eficiente para la obtención de neomachos.

Palabras clave: andrógenos, inmersión, neomacho.

Key words: androgens, female sex reversal, immersion.

Validación de la técnica para la identificación de Regiones Organizadoras de Nucléolos en riñón de adultos de *Rhamdia quelen*

Validation of the technique to identify nucleolus organizer regions in adult kidney *Rhamdia quelen*

Luz Natalia Quintero Zuluaga¹, Zoot; Daniel Londoño Cartagena¹, Zoot; Liliana María Cardona Bermúdez^{1,2}, Zoot, MSc; Mónica Botero-Aguirre^{1,2}, Zoot, PhD.

¹Grupo GRICA, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. ²Docente Escuela de Producción Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia

La obtención de organismos poliploides se ha logrado artificialmente mediante la utilización de diferentes tratamientos físicos y químicos. Su estandarización ha sido objeto de estudio por varios autores dadas las ventajas que presentan estos individuos como la eficiencia en producción de carne, el control poblacional dado la condición de esterilidad y la conveniencia para programas de repoblamiento. A pesar de las múltiples ventajas que ofrecen los organismos poliploides y las posibilidades de obtención de estos individuos en Colombia no se ha validado una técnica confiable, económica y de fácil replicación que permita identificar

en campo la condición de ploidía de las poblaciones naturales de peces y de aquellos individuos de condición triploide o tetraploide que han sido sometidos tempranamente a tratamientos físicos o químicos. Por tal motivo, esta propuesta de investigación tuvo como propósito validar la técnica para la identificación, la cuantificación y la caracterización de la expresión de RON's en células de riñón de animales adultos machos y hembras de la especie *Rhamdia quelen*, técnica que sirvió en la identificación de ploidías de ejemplares adultos de la especie, con posibilidad de replicación de la técnica en individuos sometidos a tratamientos biotecnológicos aplicables a diferentes especies de peces. Se empleó un diseño de clasificación experimental, en bloques aleatorizado, efecto fijo, balanceado, con tres tratamientos y cuatro replicaciones por tratamiento, donde se convalidaron los supuestos asociados con el diseño experimental. En la obtención de suspensión celular de porciones de riñón se analizaron regiones cromosómicas específicas que forman y mantienen el núcleo durante la interfase llamadas regiones organizadoras nucleolares (RON) mediante tratamientos hipotónicos y de fijación, con el fin de determinar la ploidía para la especie. Las cuatro variables evaluadas fueron: Expresión de Regiones Organizadoras de Nucléolo, Frecuencia de Expresión de Regiones Organizadoras de Nucléolo, Distribución celular y Nitidez de la placa. La técnica combinada de los protocolos de tinción de RON's con sus respectivas modificaciones es un método eficiente, rápido y confiable para identificar individuos triploides de *Rhamdia quelen* y adicionalmente es un trabajo pionero en el reporte de las frecuencias de triploidías en esta especie.

Palabras clave: células, poliploidías, tinción.

Key words: cells, polyploidy, staining.