

**EFICIENCIA DEL USO DE LA TRIPSINA COMO TRATAMIENTO PARA
COMBATIR EL HERPESVIRUS BOVINO-1 EN PROGRAMAS DE
TRANSFERENCIA DE EMBRIONES**

ELIANA SOFÍA ESCOBAR BARRERA

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA- UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS PECUARIAS Y DEL MEDIO
AMBIENTE- ECAPMA**

PROGRAMA DE ZOOTECNIA

BOGOTÁ

2017

**EFICIENCIA DEL USO DE LA TRIPSINA COMO TRATAMIENTO PARA
COMBATIR EL HERPESVIRUS BOVINO-1 EN PROGRAMAS DE
TRANSFERENCIA DE EMBRIONES**

Monografía

Para obtener el título de

ZOOTECNISTA

ELIANA SOFÍA ESCOBAR BARRERA

Asesor:

ALEXANDER NIVIA OSUNA Z, Msc

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA- UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS PECUARIAS Y DEL MEDIO
AMBIENTE- ECAPMA**

PROGRAMA DE ZOOTECNIA

BOGOTÁ

2017

Agradecimientos

Debo extender un especial agradecimiento a los profesores Edwin Manuel Páez Barón y Alexander Nivia Osuna por aceptar como jurado el primero, y como director, el segundo, de este trabajo de monografía. Su apoyo y confianza fueron esenciales para la realización de este documento, al igual que su orientación y rigurosidad; características claves en el desarrollo de esta revisión.

A mis padres Mauro Escobar y Gloria Barrera por todo el apoyo y cariño que me han brindado durante este tiempo. Al igual, por el gran esfuerzo que realizaron a lo largo de este proceso para que pudiera cumplir este sueño que ahora es una realidad; a mi sobrina María José Ochoa, quien con su amor y compañía siempre fue mi motor para no desfallecer en momentos críticos. A mi novio Edgar Galindo, por todo el respaldo y colaboración brindada en la parte final de mi carrera.

A todos mis compañeros y demás personas que de una u otra manera contribuyeron con mi formación profesional.

RESUMEN

El herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1), es un agente de tipo viral caracterizada por sus altos niveles de contagio y por ser el desencadenante de patologías como Rinotraqueitis Bovina Infecciosa (IBR), Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV) en hembras y Balanopostitis Pustular Infeccioso (IPB) en machos. Su impacto puede ser nefasto debido, en gran medida a que los niveles de morbilidad pueden ser excesivamente altos, si no se tiene un adecuado control. Dentro de los signos clínicos más representativos se encuentran relacionados con secreción nasal serosa, taquipnea y disnea; así mismo, se presenta una marcada conjuntivitis. Ante este escenario tan complejo, es posible observar diversos impactos dentro de la estructura productiva del hato ganadero, que van desde los costos económicos hasta la mortalidad de los ejemplares afectados.

Por ello las investigaciones revisadas, se enmarcan desde la consolidación de procesos de tratamiento que permita mitigar estos efectos tan nocivos, utilizando la tripsina, como principal componente. Su aplicación se realizó teniendo en cuenta los procedimientos de lavado de embriones establecidos por la IETS y sobre grupos experimentales con distintas particularidades.

De la revisión es posible concluir la efectividad de los tratamientos con diferentes compuestos de tripsina, en relación con la erradicación del impacto producido por el desarrollo de estas patologías en el hato; ya que se pudo determinar que se redujo del 88% de los embriones infectados -en un grupo de control- al 29%, luego de efectuar los procedimientos con tripsina.

Palabras claves: Rinotraqueitis Bovina Infecciosa (IBR), Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV), Balanopostitis Pustular Infeccioso (IPB), taquipnea, disnea.

ABSTRACT

Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is a viral agent, characterized by its high levels of infection and the triggering of pathologies such as Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), Infectious Pustular Vulvovaginitis (IPV) in females and Balanopostitis Pustular Infectious (IPB) in males. Their impact can be disastrous, due in large part to the fact that levels of morbidity can be excessively high, if one does not have adequate control. Among the most representative clinical signs are serous nasal secretion, tachypnea and dyspnea; Likewise, marked conjunctivitis occurs. Given this complex scenario, it is possible to observe various impacts within the productive structure of the cattle herd, ranging from economic costs to the mortality of affected individuals.

For this reason, the investigations reviewed are framed by the consolidation of treatment processes to mitigate these harmful effects, using the trypsin as the main component. Its application was made taking into account the embryo washing procedures established by the IETS and on experimental groups with different peculiarities.

From the review it is possible to conclude the effectiveness of the treatments with different trypsin compounds, in relation to the eradication of the impact produced by the development of these pathologies in the herd; Since it could be determined that it was reduced from 88% of the infected embryos - in a control group - to 29%, after performing the procedures with trypsin.

Key words: Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), Infectious Pustular Vulvovaginitis (IPV), Balanopostitis Pustular Infectious (IPB), tachypnea, dyspnea.

ÍNDICE

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INDICE.....	6
Lista de Abreviaturas.....	7
1. Problema de investigación	9
1.1. Descripción del problema	9
1.2. Efectos del BHV-1 sobre la estructura de producción del hato	10
2. Justificación	13
3. Objetivos.....	15
3.1. Objetivo general.....	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. Marco Teórico	16
4.1 Herpesvirus bovino tipo 1	16
4.2 Biotecnologías reproductivas.....	19
4.2.1 Transferencia de embriones	21
4.3. Uso de la tripsina para combatir el BHV-1.....	26
4.3.1. Descripción del tratamiento con tripsina.....	28
4.3.2. Procedimiento para el uso de la tripsina y resultados	32
CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS	42

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BHV-1	Herpes Virus Bovino1
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
I.A.	Inseminación artificial
IBR	Rinotraqueitis Infecciosa Bovina
IETS	Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.
IPB	Balanopostitis pustular infecciosa
IPV	Vulvovaginitis pustular infecciosa
MOET	Multiovulación y transferencia de embriones
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
PFU	Unidades Formadoras de Placa
T.E.	Transferencia de embriones
CTU	Células de las trompas uterinas (Uterine Tubal Cells)
ZP	Zona pelúcida

INTRODUCCIÓN

En los actuales sistemas de producción animal, se hace necesaria la implementación de nuevas técnicas en el ámbito reproductivo con el fin de lograr la optimización de las características más deseables en las diferentes especies y, en particular, en los bovinos. De esta manera, se logra conseguir, ejemplares con las condiciones idóneas que puedan expresar sus máximas condiciones genéticas en el hato. Dentro de las biotecnologías más destacadas, es posible señalar la inseminación artificial (IA) y la transferencia de embriones (TE) como dos de las principales herramientas utilizadas para el mejoramiento genético.

En este sentido, es fundamental señalar las medidas sanitarias como un punto importante a la hora de implementar estas biotecnologías, pues lo ideal es realizar el procedimiento libre de enfermedades virales, asociadas a malas manipulaciones del material genético. Dentro los agentes infecciosos, se puede destacar la presencia de enfermedades como la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) o Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV) que afectan a los bovinos de cualquier edad (Murphy *et al.*, 1999). El agente causal es el Herpesvirus bovino tipo-1 (HVB-1) quien pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae y género Varicellovirus (Fauquet *et al.*, 2005), el cual causa un impacto en los sistemas de producción afectando los indicadores productivos, reproductivos y económicos.

Por lo cual, este documento tiene como objeto realizar una revisión bibliográfica sobre la eficiencia del uso de la tripsina como tratamiento para combatir el herpesvirus bovino-1 en programas de transferencia de embriones.

1. Problema de investigación

1.1. Descripción del problema

Se evidencia un amplio avance investigativo en el desarrollo de biotecnologías reproductivas y de su aporte al mejoramiento genético de los bovinos, permitiendo la difusión de genes en una medida mayor a la reproducción fisiológica (Larocca *et al.*, 2004). Para cumplir con dicho cometido, se han incorporado como estrategias algunas tecnologías en las que se destacan la inseminación artificial y la transferencia de embriones, siendo esta última una de las biotecnologías de mayor relevancia, dado que en el mundo se contaba con 732.227 embriones transferibles en el año 2010 (IETS, 2011). Lo anterior representó un incremento del 4,25% con respecto al año 2009, en el cual se contaba con 702.358 embriones transferibles (IETS, 2011). En cuanto a la participación de los diferentes continentes, en el año 2010 el continente con mayor cantidad de embriones transferibles fue Norteamérica, con una cantidad de 338.540, seguido por Asia con 131.718 embriones y Europa con 117.813 embriones (IETS, 2011). Suramérica apenas alcanzó la cifra de 77.643 embriones, superando únicamente a Oceanía y a África que logaron las cifras de 56.775 y 9.738 embriones, respectivamente (IETS, 2011). En resumen, Norteamérica representó en el año en mención, es decir en 2010, el 42,95% del total de embriones transferibles del mundo, un porcentaje muy cercano a la mitad (IETS, 2011). En el caso de Suramérica, los dos países con mayor participación fueron Brasil, con 38.975 embriones, y Argentina, con 24.263 embriones (IETS, 2011).

Ahora bien, una vez evidenciada la importancia de las biotecnologías es primordial describir el impacto que genera la presencia de agentes patógenos, entre ellos el Herpesvirus Bovino 1, el cual genera un impacto económico y productivo en los sistemas de producción animal, debido a las manifestaciones clínicas que éste presenta como abortos, rinotraqueitis infecciosa bovina, vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), balanopostitis pustular infecciosa (IPB), conjuntivitis, enteritis y encefalitis, razones que hacen que sea un motivo de preocupación en los hatos.

Al evaluar el impacto en la productividad como las condiciones sanitarias de los animales donde intervienen dichos agentes patógenos, es posible considerar que estas enfermedades virales afectan directamente el tracto respiratorio y genital de los animales. De igual forma, puede producir infecciones latentes, lo cual tiene una significativa importancia

epizootiológica dado el peligro que representan los animales sin manifestaciones clínicas y serológicamente negativos pero que pueden liberar virus bajo condiciones de estrés, convirtiéndose en un riesgo de infección permanente para otros animales (Avila *et al.*, 2008).

1.2. Efectos del BHV-1 sobre la estructura productiva del hato

Una breve apreciación final, precisa identificar algunos de los aspectos más preocupantes que produce esta enfermedad a la empresa ganadera. Uno de ellos, tiene que ver con las pérdidas económicas que esto acarrea en el hato, ya que incide de manera directa en la eficiencia reproductiva de los animales (Martinez & Riveira, 2008).

Por su naturaleza tan nociva, el BHV-1 ha llevado a pérdidas económicas significativas en la industria lechera y cárnica, dadas sus tendencias endémicas en países con altos índices de producción bovina, de modo que el 60 y 80% del ganado presenta anticuerpos frente al agente y el 1 y 2% es persistente a estar infectado (Houe, 1999). Es por eso que las complicaciones clínicas, asociadas a la enfermedad, se reflejan en unos mayores costos de tratamientos de eliminación del virus, en donde el hato puede ver afectadas sus utilidades en la medida en que estos se hacen más onerosos.

Ahora bien, no es solo la representación de los costos monetarios del tratamiento, sino que se incurre en otras dificultades como la pérdida de ejemplares de calidades genéticas óptimas, en la proliferación de abortos, en la pérdida de peso y en la disminución de la producción de leche, circunstancias que afectan directamente el desarrollo de las actividades diarias del hato (Ruiz *et al.*, 2012).

Es importante considerar que generalmente las enfermedades infecciosas como el BHV-1 tienen como consecuencia problemas reproductivos. De ellos, el aborto es quizás el que más impacto ocasiona de todas las enfermedades reproductivas (Romero, 1999). El aborto trae consigo diferentes tipos de pérdidas entre las cuales se incluyen las pérdidas de tiempo/mano de obra, el tiempo reproductivo, los insumos para inseminación artificial y otros insumos usados para el cuidado de la vaca en estado de preñez (Bermúdez, 1998).

En Colombia se han obtenido cifras que revelan que en explotaciones ganaderas de doble propósito y carne el porcentaje promedio de aborto por causas múltiples es de 4,1%, mientras que en explotaciones de producción de leche el porcentaje de aborto es del 5% (Romero, 1999). En Venezuela, se estima que el 5% de las preñeces bovinas terminan en aborto, tasa que puede aumentar hasta un 10% anual en hatos en los cuales se presentan enfermedades que se hallan enraizadas en la finca, generalmente de tipo infeccioso (Bermúdez, 1998). En tanto, en Argentina la tasa de mortalidad entre la preñez y el destete oscila entre el 5% y el 15%, estimándose un promedio entre el 7 y el 10% (Acosta *et al.*, 2016).

Para llevar las anteriores cifras a términos monetarios, se puede calcular que en una finca promedio bajo el sistema de producción extensivo tradicional con una proporción de aborto del 4% y con un precio del ternero recién nacido de U\$100, se tendría una pérdida por terneros no nacidos de US\$2,00 por vaca/año, si se considera como única pérdida la muerte del ternero (Romero, 1999). Sin embargo, realizando un análisis más integral, se tiene que en el sistema de leche con una tasa de natalidad del 75%, con una producción promedio de leche por vaca de 11,13 litros por día y con la proporción de abortos del 5%, las pérdidas por vaca por año pueden llegar a una cifra de U\$29,85. Estos datos son el resultado de sumar las pérdidas por terneros (macho: US\$30 y hembra: US\$300) más el detrimento de la fertilidad y sumar también la disminución de la producción de leche esperada, considerando un precio de mercado promedio de U\$0,27 (Romero, 1999). En otros estimativos, se ha llegado a la cifra de pérdida de U\$96,2 por vaca por ciclo de monta, incluyendo mano de obra calificada, insumos de inseminación artificial y semen (Bermúdez, 1998).

Así mismo, las enfermedades infecciosas influyen negativamente en el número de servicios por preñez ya que el óptimo se considera de 1,6 servicios por preñez, mientras que cuando se tiene una situación epidémica, el promedio asciende a 3,3 servicios por preñez (Romero, 1999). En consecuencia, para realizar un cálculo económico incluyendo esta nueva variable, se obtiene que partiendo de una base de natalidad para sistemas de producción de leche intensivos del 75%, una producción de 2.500 litros por vaca por año, con un promedio de 3,3 servicios por preñez y a eso se suman los costos de inseminación artificial, la disminución del número de terneros y la reducción de la producción de leche, las pérdidas pueden alcanzar la suma de U\$131,22 por vaca por año (Romero, 1999). En

Venezuela se realizó un estudio en tres Estados durante un año, tomando la información de por lo menos 2 empresas ganaderas por Estado y una base de 100 vacas en cada uno, obteniendo como resultado pérdidas por concepto de abortos de U\$3.096 en Apure, U\$2.598 en Barinas y U\$3.157 en Zulia, cifras que llaman la atención por lo elevadas (Bermúdez, 1998).

En el departamento de Nariño, Colombia, se hizo un estimado de pérdidas sobre una cantidad de 100.00 animales, considerando los siguientes costos al año 2008: Litro de leche \$700, kilo de carne en pie \$3.000, valor de una vaca de 2 años \$2.500.000, valor de un ternero recién nacido \$100.000. Se realizó el análisis económico tomando como base una prevalencia de la enfermedad del 8,6% y una tasa de abortos del 10%, con lo cual se obtuvieron las siguientes cifras de pérdida: \$86.000.000 por abortos, \$22.500.000 por mortalidad en vacas, \$1.518.334.300 en pérdida de producción de leche por año y \$645.000.000 de pérdida en producción de carne (Astaiza *et al.*, 2012).

En la Provincia de Corrientes, Argentina, se contaba en marzo de 2016 con un inventario de 2.310.485 vacas y 580.790 terneras, por lo cual, al aplicar el estimado del 10% de la tasa promedio de aborto, se perderían al año un promedio de 290.028 hembras, con un valor de \$384 por cada una, generando una pérdida total de \$111.370.752 por año (Acosta *et al.*, 2016).

Con la anterior información se puede inferir que las pérdidas causadas por las enfermedades infectocontagiosas, entre las cuales se incluye el HVB-1, no sólo son medibles sino que son cuantiosas para la actividad ganadera y representan un verdadero reto en el sostenimiento económico de la actividad de pequeños y grandes productores.

2. Justificación

La utilización de biotecnologías reproductivas puede contribuir a exitosos programas de mejoramiento animal logrando maximizar la eficiencia de los sistemas de producción a través del incremento en los indicadores reproductivos. La causa fundamental de dicho avance se debe principalmente al progreso genético que ha tenido la población bovina en general, inducida por la proliferación de animales de excelentes condiciones genotípicas, a través del desarrollo de biotecnologías como la producción de embriones *in vivo* e *in vitro*.

En el mundo se cuenta con más de 700.000 embriones transferibles por año, lo cual hace que este tema haya dejado de ser experimental para convertirse en una tendencia de índole universal requiriendo de una mayor atención a los factores que pueden generar riesgo para el empleo de las biotecnologías reproductivas.

De estas tecnologías se derivan riesgos tales como: la transmisión de agentes patógenos, destacando el Herpesvirus Bovino 1, el cual, repercute no solo en el plano sanitario sino en términos productivos del hato logrando resultados contrarios a los deseados en un proceso de mejoramiento reproductivo. Sin embargo, para mitigar dichos riesgos se han implementado diferentes estrategias para disminuir o eliminar la posibilidad de transmisión. Razón por la cual, se hace necesario tener amplio conocimiento sobre las técnicas procedimentales para la prevención de los diferentes riesgos sanitarios que se presentan en los programas de transferencia de embriones.

Las pérdidas que se generan en los hatos ganaderos como consecuencia de la presencia de agentes infecciosos como el BHV-1, no son únicamente de calidad de los animales sino que también son económicas y pueden ser cuantificadas de acuerdo al impacto de las diferentes variables que intervienen en el proceso, como lo son la disminución de la producción de leche, la pérdida de terneros como consecuencia de los abortos, el aumento del promedio de servicios por preñez y la reducción de las tasas reproductivas. Para ello se considera el promedio de producción de leche por vaca, el promedio de crías por vaca, el promedio de abortos, el precio promedio de los terneros y, por supuesto, el precio promedio del litro de leche, con lo cual se alcanzan cifras superiores a los US\$100 por vaca por año.

Adicional a lo anterior, es primordial considerar la importancia que tiene la ganadería a nivel socioeconómico. En primer lugar, el ganado es fuente de alimento, primordialmente

en cuanto a su carne y a su leche y en estos momentos en los cuales se vive una verdadera incertidumbre acerca de la seguridad alimentaria en el mundo, el ganado es una alternativa fundamental para cualquier programa de producción sostenible de alimentos tanto en los países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo. En segundo lugar, la explotación pecuaria inicia desde la más baja cantidad de unidades por productor, dándose casos en los cuales se convierte en la fuente principal de sustento y de trabajo de comunidades rurales que dependen en gran medida de su actividad pecuaria, por lo cual es indiscutible su aporte en la generación de empleos y de ingresos familiares. En consonancia con lo anterior, la ganadería representa un factor fundamental en el desarrollo agrícola sostenible y en la seguridad alimentaria familiar.

En cuanto a la prospectiva de crecimiento de la actividad ganadera, es importante señalar que el aumento del precio de la carne ha generado un aumento en el precio del ternero y del novillo terminado. Por lo tanto, esta circunstancia se convirtió en un estímulo para la actividad de cría, trayendo como consecuencia un aumento en la tasa de retención de hembras, pues aquellas que eran destinadas a faena, cada vez más están siendo reservadas como futuros vientres. En países como Argentina, Uruguay, el sur de Brasil y varios sectores de la geografía de Colombia, la ganadería compite en tierra con los cultivos agrícolas, por lo cual un alto valor de la carne mejora la competitividad del sector ganadero en complemento con la agricultura que cada región necesita.

Por las razones anteriormente expresadas, se hace necesario la revisión bibliográfica sobre el uso de la tripsina y su efectividad como tratamiento para combatir el herpesvirus bovino-1 en los programas de transferencia de embriones y de esta manera poder contribuir con el mejoramiento genético animal y finalmente, maximizar los parámetros sanitarios, productivos y reproductivos de los sistemas de producción bovina.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Realizar una revisión bibliográfica sobre la eficiencia del uso de la tripsina como herramienta preventiva contra el herpesvirus bovino-1 en los programas de transferencia de embriones.

3.2 Objetivos específicos

- Describir los métodos en los que se emplea la tripsina para combatir el herpesvirus bovino-1 (BHV-1) en programas de transferencia de embriones.
- Comparar la eficiencia de la tripsina de origen animal y la tripsina bovina recombinante TrypLE™ como tratamiento para combatir el herpesvirus bovino-1 (BHV-1) en programas de transferencia de embriones.

4. Marco Teórico

4.1 Herpesvirus bovino tipo 1

El Herpesvirus bovino (cuyas siglas son BHV-1), es definido como un virus de genoma DNA que pertenece a la familia Herpesviridae, a la subfamilia Alphaherpesvirinae y al género Varicellovirus. Su impacto negativo se puede evidenciar en las afectaciones al ganado bovino que tienen como consecuencia una amplia serie de situaciones clínicas y de pérdidas económicas a los ganaderos (Pidone *et al.*, 1999).

Ha sido posible describir dos subtipos de BHV-1: “*BHV-1 subtipo 1*” representan cepas que causan enfermedad respiratoria como: Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) con afectaciones en el tracto respiratorio, que puede lesionar los bronquios mayores de los animales infectados, afectando el parénquima pulmonar (Betancur *et al.*, 2006; Aguilar, 1987). Mientras que el “*BHV-1 subtipo 2*” incluye cepas que causan enfermedad genital, como Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV) y Balanopostitis Pustular Infecciosa (IPB) provocando abortos, baja fertilidad y hasta la muerte (Betancur *et al.*, 2006).

La enfermedad se caracteriza por síntomas clínicos respiratorios, como descargas nasales muco-purulentas y conjuntivitis, síntomas generales como fiebre, depresión, inapetencia y reducción de la producción de leche (OEI, 2010). Así mismo, las complicaciones sanitarias, se extienden hasta el desarrollo de una infección venérea caracterizada por infertilidad temporal, al igual que dermatitis, mastitis y metritis y la forma encefálica descrita como una enfermedad altamente mortal en terneros (Betancur *et al.*, 2006) y la necrosis focal de las membranas mucosas nasales, laríngeas, traqueales o genitales (OEI, 2010).

Después de muchos análisis y verificaciones se ha establecido que el BHV-1 se disemina con gran facilidad a la mayoría del ganado de un hato, presentando un alto porcentaje por infecciones respiratorias y en una pequeña proporción, se realiza por infecciones genitales. La transmisión del BHV-1 se ve facilitada cuando ocurre de manera directa de un bovino a otro en los términos explicados con antelación. Sin embargo, no debe descuidarse la infección indirecta, que es la que se produce a través de las personas que intervienen en el proceso o de los equipos utilizados en los programas de transferencia de embriones (Bielanski *et al.*, 2001).

En ese orden, las principales fuentes de infección directa del BHV-1 son los exudados nasales, las secreciones genitales, el semen, los fluidos fetales y/o toda aquella forma de contacto entre animales infectados (Pidone *et al.*, 1999). Así mismo, existen medios indirectos de contagio, como los procesos de biotecnologías reproductivas, en los cuales, también se encuentra un peligro latente ante la desatención de normas sanitarias en el manejo de todos los materiales.

En el país, se ha reportado *“en hembras bovinas una seroprevalencia del 51.7% para la región Caribe, un 21.5% para la región Andina y un 20.6% para el piedemonte llanero. En toros de la sabana de Bogotá se encontró un 15.3% de reactores positivos; sin embargo, son pocos los aislamientos virales. En un informe de 2952 muestras de suero bovino, procedentes de diferentes regiones del país, por la técnica de ELISA, se reportó un 53.4% de positividad a IBR. En un estudio realizado en los departamentos de Córdoba y Sucre, entre los años 1980-1984, se encontró una prevalencia del 29.6% en muestras de suero provenientes de 2295 bovinos. El estudio demostró que no existieron diferencias significativas entre el ganado lechero y el de carne y que los índices de prevalencia*

aumentaron progresivamente conforme aumentó la edad de los animales” (Betancur et al., 2006).

Por último, se tiene que los efectos económicos, tienen un impacto negativo para los ganaderos, en la medida en que se producen pérdidas por la generación de abortos, especialmente los provocados en la segunda mitad de la gestación sin que se presente alguna señal clínica indicativa. El virus BHV-1 está presente en todo el mundo y las muestras de sangre tomadas a los bovinos mayores de tres años¹, configura una realidad de que una inmensa mayoría de ellos ha tenido contacto con el virus (Avila *et al.*, 2008).

Del mismo modo, es prudente establecer que esta enfermedad no presenta una alta tasa de mortalidad ya que sus índices representan un leve 1% de los casos (Pidone *et al.*, 1999). No debe decirse lo mismo de su impacto económico, ya que consecuencias como los abortos, las pérdidas de neonatos y, en general, la disminución de los resultados de la producción de leche, repercute directamente sobre la productividad del hato. En Colombia se tuvieron pérdidas estimadas en la ganadería de \$27.000 millones en el año 1993, las cuales ascendieron a \$42.000 millones en el año 1.999 (Astaiza *et al.*, 2012). En lo concerniente con las pérdidas generadas por las enfermedades infecciosas, Romero *et al.* (1999), calculan que el promedio de pérdida por año por vaca es de U\$131,22, con una base de natalidad del 75%, una producción de 2.500 litros por vaca por año, un promedio de 3,3 servicios por preñez, costos de inseminación artificial, disminución del número de terneros y la reducción de la producción de leche. Con esa cifra, adquiere importancia el costo de las pérdidas generadas en ganadería por enfermedades infecciosas en Colombia, que para el

¹ Aunque el ganado bovino es el principal receptor del virus BHV-1, otras especies de rumiantes tales como los caprinos o los ovinos, y hasta el cerdo, son susceptibles de recibir este virus. Actualmente se utilizan conejos de manera experimental para estudiar el virus BHV-1.

año 2014 contaba con un inventario de 18'672.236 cabezas de ganado, de las cuales, 12'516.695 eran hembras (Fedegán, 2014).

4.2 Biotecnologías reproductivas

Este término sirve para señalar a la serie de biotécnicas que permiten aumentar la productividad, la tasa de mejoramiento genético y la eficiencia reproductiva de los animales², a fin de obtener una mejor calidad de los productos y su eficiencia reproductiva (Mellisho, 2007). *“Representa uno de los productos más emblemáticos de la investigación y dominio de las ciencias de la vida y la zootecnia porque logró incrementar, con éxito, el progreso genético de los hatos, destinados a la producción de leche, lana, pelo y carne”* (Palma, 2008).

Estas biotecnologías, se distinguen de cualquiera de las técnicas génicas, en la medida en que no se ocupan de alterar el genoma animal aunque sí guardan una estrecha relación y en la actualidad justifican su existencia motivándolas a un mayor desarrollo de su espectro investigativo (Palma, 2008). Ahora bien, para ahondar en el marco explicativo de estas biotecnologías se hace necesario realizar una breve exposición de las principales técnicas con una breve definición.

- **Inseminación Artificial (IA)**: Es definida como la aplicación de semen en el tracto genital de la hembra en el momento efectivo de la fecundación (Restrepo, 2008). De igual manera, se define como *“la introducción artificial de semen, dentro del cuerpo del útero, en el momento del celo con el fin de producir una preñez”* (Castellanos, 2007).

² Esta eficiencia se traduce, en un mayor número de crías obtenidas por animal, en un periodo de tiempo.

- **Fertilización In-Vitro (FIV):** Es un término que implica, *per se*, la realización de procedimientos dentro de un laboratorio involucrando el control de mecanismos de maduración e interacción de los gametos femeninos y masculinos en un ambiente artificial con el fin de producir embriones (Filipiak & Larocca, 2012). Es una técnica que bien manejada puede conducir a un mejor aprovechamiento del material genético de la hembra y los rasgos deseables en los animales se pueden incrementar, como resultado de una adecuada escogencia de los oocitos y el semen para el proceso de fertilización (Restrepo, 2008).

Así dicho, la biotecnología reproductiva moderna, tiene su asiento en técnicas perfeccionadas a través de la ingeniería genética, desarrolladas para modificar y transferir genes de un organismo a otro (Rodríguez *et al.*, 2011). Además de ello, “*contemplan la manipulación de las células germinales reproductivas, el manejo reproductivo y la conservación de los seres vivos*” (Rivera, 2013). En este sentido, el desarrollo de dichas técnicas ha permitido no sólo el avance sistemático de las características genotípicas de las especies de cada región, sino de la incorporación de nuevas razas y biotipos foráneos que cumplen y/o complementan los atributos genéticos de los animales nativos.

Así dicho, las herramientas de tecnología en reproducción, presentes y producto de años de investigación científica, han sido la base para el avance y desarrollo de otros procedimientos más complejos. De igual manera, “*es de gran importancia tener en cuenta la relevancia que ha obtenido la Biotecnología Reproductiva en especies como equinos, ovinos, porcinos, caninos, ya que inicialmente estuvo circunscrita a la especie bovina en relación con la Inseminación Artificial IA y posteriormente a la Transferencia de Embriones TE, seguida de la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo IATF, Fertilización In*

Vitro FIV, Transplante de Embriones a Tiempo Fijo TETF y Manipulación de Células Germinales Reproductivas en investigaciones sobre sexaje de semen y embriones, Clonación y Fecundación Intra Citoplasmática etc.” (Rivera, 2013).

4.2.1 Transferencia de embriones.

“*La transferencia de embriones (TE) es el proceso por el cual un embrión es recolectado (lavado) desde una hembra (donante o donadora) y transferido a otra hembra (la receptora) para completar el periodo de gestación*” (Restrepo, 2008).

Su finalidad principal está en fomentar en una mayor proporción la genética superior del ganado mediante la reducción de los intervalos generacionales (Machaty, 2012), apoyado en la difusión de los genes de la hembra donadora (Filipiak & Larocca, 2012). Así mismo, dentro de los propósitos generales de la TE se encuentra el control de enfermedades no transmisibles por esta vía, al igual que, permitir la conservación del material genético mediante la congelación de embriones por un periodo extenso de tiempo (Restrepo, 2008).

Lo más común es que la TE de bovinos se realice con embriones que tengan entre 6 y 8 días de desarrollo, ya que en este periodo de tiempo se disminuyen altamente las posibilidades de contaminación. Además, en esta etapa, se cuenta con una membrana pelúcida más resistente e impermeable a la inmensa mayoría de los agentes que podrían causar infección entre los cuales están parásitos, hongos y bacterias que definitivamente, no pueden ingresar debido a su tamaño³. De esta forma, las posibilidades entonces se reducen únicamente a los virus (McVicar *et al.*, 1986).

Del mismo modo, las condiciones adecuadas de manipulación reducen sustancialmente la probabilidad de transmisión agentes patógenos. En este sentido, es preciso recalcar que

³ El cual es significativamente más grande que el de la membrana pelúcida intacta.

cualquier microorganismo constituye un peligro potencial, unos en mayor medida que otros⁴ hasta el punto en que han sido investigados más de cincuenta agentes diferentes con el fin de prevenir su presencia en el proceso de transferencia de embriones (Alberio, 2008). Ahora bien, en cuanto a la transmisión de enfermedades por el embrión, es probable que éstas se originen por la presencia de agentes patógenos en este y/o a causa del líquido en el que es transportado. Cualquiera que sea la razón, los riesgos de contaminación embrionaria se han clasificado en cinco tipos de riesgo: la contaminación intranuclear, la inclusión de un agente patógeno en el embrión, la probabilidad de que haya agentes patógenos en el útero, contaminación al momento de realizar las manipulaciones *in vitro* y el riesgo de transmisión de agentes patógenos en el momento de llevar a cabo maniobras destinadas a la TE (Alberio, 2008).

- **La inclusión de un agente patógeno en el embrión, bien sea al momento de la fecundación o debido a la acción propia del mismo agente:** Para diferenciar entre estas dos posibilidades hay que decir que se ha encontrado que, al menos en el caso de las enfermedades lengua azul y BHV-1, los espermatozoides se encontraron fuertemente pegados al agente cuando provenían de toros infectados. Lo anterior abriría la opción de que exista la potencialidad de infectar al producirse la fecundación. Ahora bien, si se cuenta con todas las precauciones para seleccionar a un toro donante la probabilidad de que esto ocurra es mínima.
- **La probabilidad de que haya agentes patógenos en el útero:** En condiciones naturales es muy poco probable que se encuentre la existencia de agentes patógenos ya sea en las trompas o en el útero. Lo preocupante es que algunos virus, en

⁴ Los virus, presentan características biológicas que los hacen el enemigo más importante. Las bacterias y demás microorganismos, como agentes de riesgo, presentan una menor trascendencia.

algunas especies, pueden obtener protección al estar pegados a la superficie de la membrana pelúcida y de esta manera no logran ser eliminados mediante el lavado como por ejemplo ocurre con los virus de la rinotraqueítis y de la vulvovaginitis pustular infecciosa.

- **Riesgo que se produzca contaminación al momento de realizar las manipulaciones *in vitro***: La manipulación normal pueden ser fuente de contaminación, como es el caso de los momentos de búsqueda, de evaluación, de lavado y de acondicionamiento. Sin embargo, hay otras manipulaciones que pueden provocar la ruptura de la membrana pelúcida como lo son la congelación, la bisección o el biopsiado para realizar el sexaje. Por lo anterior, es que se insiste en contar con medios controlados y debidamente esterilizados antes de la manipulación.

En este contexto, es importante señalar que el proceso de transferencia de embriones comprende dos etapas fundamentales, en las cuales se puede transmitir una enfermedad: la fase *in vivo* y la fase *in vitro* y; en cualquiera de las dos si no se tienen los cuidados pertinentes es muy probable que se adhieran agentes no deseados que desencadenan complicaciones futuras. Con respecto a la fase *in vivo*, se tienen presentes los animales, bien sean toros o vacas. Por supuesto que el animal donante es potencialmente un vector de agentes patógenos que podría llevar al embrión enfermedades y la forma de contrarrestar esa posibilidad es utilizar las metodologías de laboratorio (Restrepo, 2008).

Para ahondar en el tema hay que profundizar en las precauciones sanitarias haciendo énfasis en los procedimientos de lavado de embriones, entre los que se debe seguir un proceso secuencial y definido de modo tal que cumpla con su objetivo fundamental de prevención de patologías en el embrión. En primer lugar, hay que revisar

microscópicamente, que su zona pelúcida se encuentre intacta antes de realizar la criopreservación, ya que como se ha recalado a lo largo de este documento esta membrana es una barrera muy efectiva para los microorganismos (Alberio, 2008).

Seguidamente, se debe poseer una preparación efectiva del medio diluyente⁵ con el que el embrión entre en contacto garantizando que se encuentre libre de contaminantes y microorganismos vivos. La esterilidad del componente proteico se garantiza con el uso tanto de albúmina de suero bovino (BSA, bovin serum albumin), fracción V o suero con radiación gamma. De igual modo, la esterilización de los equipos debe ser un elemento fundamental en la prevención del contagio, los cuales deben ser lavados con un detergente no tóxico, enjuagados muy bien con agua destilada, secados y posteriormente envueltos para su esterilización (IETS, 2003).

En algunas investigaciones, Bielanski *et al.* (2001) ha propuesto, como medida adicional en el proceso de prevención de contagio de patógenos, una fase de vigilancia relacionada con las vacas receptoras. Si bien han sido categorizadas como hembras sanas luego del proceso de transferencia de embriones deben mantenerse en cuarentena, durante el tiempo que sea necesario y que garantice que no habrá seroconversión ni la presencia de signos clínicos (Alberio, 2008). Por último, hay que plantear que sea cual sea la decisión en cuanto al control que se realice sobre la TE, se ha demostrado que la profilaxis del estado sanitario de los donantes tiene una incidencia definitiva en el resto del proceso (El Azhary *et al.*, 1980). Ahora bien, ante la proliferación de vectores de transmisión patógena, es posible ejecutar procedimientos que mitiguen su efecto y, en dado caso, logren reducir su probabilidad de ocurrencia en una proporción considerable. Por tal motivo, es recomendable el lavado de

⁵ Hasta que un producto universalmente aceptado esté disponible, el componente sérico utilizado en la recolección, cultivo y medios de lavado de embriones destinados a la exportación, deberá ser aprobado por el país importador.

embriones bovinos, que, si bien puede tener un efecto importante, no es completamente efectivo y, ante ello, se ha planteado “*que el lavado es efectivo para eliminar altos niveles de contaminación de la mayoría de los agentes patógenos (7) de los embriones. El procedimiento de lavado recomendado comprende el transporte de embriones en grupos de 10 o menos, a través de 10 gotas con medio. Se utilizará una micropipeta estéril y nueva para cada lavado, que deberá constituir una dilución 1:100 con respecto al lavado previo. Los embriones deberán ser agitados ligeramente en cada lavado y tan pronto como se haya efectuado esto, se pasará al lavado siguiente. Únicamente los embriones del mismo donante deberán lavarse juntos*” (IETS, 2003).

En razón a lo anterior, se ha demostrado que lo más adecuado para que no se presente la transmisión del virus BHV-1 durante la transferencia de embriones es la aplicación preventiva de tripsina (Bielanski *et al.*, 2013). Cuando se usa tripsina en embriones *in-vivo* con la zona pelúcida intacta y expuestos artificialmente al virus BHV-1, los resultados han sido excelentes, con ausencia del virus BHV-1 sobre los embriones en los que se realiza este procedimiento (Lesko *et al.*, 1993).

La tripsina, es una enzima peptisada secretada por el páncreas, encargada de romper los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis para formar aminoácidos. Su forma inactiva, tripsinógeno, se convierte en tripsina por acción de una enzima secretada por el borde en cepillo de la mucosa intestinal: la enteropeptidasa o enteroquinasa (ULA, 2007).

Se utiliza en procesos de inflamación de tejidos blandos localizados como edemas y tumores de origen traumático, en inflamaciones de origen infeccioso, coadyuvante en procesos de mastitis bovina, entre otros (ULA, 2007). La tripsina pancreática porcina es la única aprobada por la IETS como desinfectante de embriones sospechosos de presentar BHV-1 y cuya efectividad ha sido evaluada por múltiples estudios (Bielanski *et al.*, 2013).

Así mismo, existen compuestos que pretenden mejorar su eficiencia y los efectos secundarios que pudiesen llegar a generar la tripsina de origen animal. En cuanto a la introducción de agentes de agentes infecciosos distintos al BHV-1, estos compuestos se realizan con base en maíz y su efectividad debe ser evaluada por procesos de experimentación más profundos (Marley *et al.*, 2008). Por último, hay que definir que el método de aplicación de la tripsina se realiza como complemento a los lavados con agentes estériles convencionales y su aplicación se debe llevar a cabo intercaladamente con ellos.

4.3. Uso de la tripsina para combatir el Herpesvirus Bovino tipo 1 (BHV-1)

En los últimos años la implementación de nuevas biotecnologías como la transferencia de embriones ha contribuido de manera favorable en el mejoramiento genético (Stringfellow *et al.*, 2004). Sin embargo, la presencia de agentes patógenos es motivo de preocupación, por lo cual se han ido incorporando tratamientos enzimáticos para descartar la presencia de virus, como el BHV-1, quien tiene la facilidad para adherirse a los espermatozoides y la zona pelúcida (ZP) de los embriones causando problemas respiratorios, reproductivos y económicos (Bielanski *et al.*, 2013).

Del mismo modo, el virus BHV-1, se replica en las células epiteliales del tracto respiratorio y reproductivo, pasadas dos horas de la infección. Cuando el virus comienza su multiplicación, se adhiere a través de las glicoproteínas de la envoltura gB, gC y gD a sus receptores en la superficie de las células hospedadoras, que son los proteoglicanos de sulfato de heparán (Avila *et al.*, 2008).

Seguidamente, la nucleocápsida penetra en el citoplasma mediante la fusión de la envoltura con la membrana celular o a través de vacuolas fagocíticas. El complejo ADN-proteína es liberado de la nucleocápsida y entra en el núcleo. Rápidamente se detiene la síntesis

macromolecular de la célula hospedadora y ocurre la replicación del ADN vírico (Byrne *et al.*, 1995). Del mismo modo, se encontró herpesvirus bovino 1 (BHV-1) en el líquido folicular, asociado con embriones FIV recolectados en hembras que fueron infectadas de modo experimental (Bielanski *et al.*, 1997).

Así mismo, la respuesta a la infección se establece en las neuronas sensoriales del ganglio trigémino, el ganglio sacro o en las tonsilas. Cuando el agente patógeno entra por la nariz, se replica a las membranas del tracto respiratorio superior y en las tonsilas; por otro lado, cuando la transmisión se presenta por vía genital, se replica en la membrana mucosal de la vagina o prepucio y se hace latente en el ganglio del sacro. En cuanto al impacto en económico en el proceso de producción de embriones bovinos, se puede destacar la presencia de enfermedades virales como es el caso de la rinotraqueitis infecciosa bovina y también de la vulvovaginitis pustular infecciosa, que son consideradas enfermedades contagiosas que logran afectar a los bovinos de cualquier edad y no únicamente a los embriones (Avila *et al.*, 2008). Estas patologías derivadas, hace que se incurran en un mayor nivel de costos para su mitigación, el cual hace aún más compleja la actividad productiva.

Por otro lado, es fundamental advertir que las medidas sanitarias que se realicen durante el proceso de transferencia de embriones, son quizás la mayor estrategia de prevención de agentes patógenos y de la transmisión de enfermedades durante la colección y la manipulación de los embriones, debido a que los microorganismos dañinos pueden adherirse y contaminar a las vacas receptoras y, en consecuencia, también transmitir enfermedades a su descendencia (Stringfellow *et al.*, 2004). Otra forma de prevención es aplicar una serie de tratamientos enzimáticos, pero debido a su costo únicamente se

emplean en el caso de una presencia cierta de agentes patógenos, para lo cual la IETS, tiene previsto la realización de unos tratamientos sugeridos.

En ese sentido, para combatir el virus BHV-1, las investigaciones han demostrado que lo más eficiente es realizar un lavado con tripsina. Actualmente, sólo la tripsina porcina ha sido aprobada por la International Embryo Transfer Society (IETS) como desinfectante para embriones sospechosos de estar expuestos a BHV-1 y otros patógenos (Brock, 1998). Aunque algunos estudios indican que esta preparación de tripsina tiene el potencial para la introducción de otros agentes infecciosos. Para excluir la posibilidad de introducir tales contaminantes a través de tripsina porcina natural, se ha desarrollado una tripsina recombinante bovina (RBTr) expresada en maíz (Stringfellow, 1998), sobre los que la experimentación ha llevado a determinar su eficiencia como herramienta de tratamiento para la mitigación de los riesgos asociados a la enfermedad del Herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1).

Es por lo anteriormente expuesto que, esta revisión documental, compila investigaciones realizadas al respecto y de las que se puede establecer un marco procedimental en común, sobre la inoculación del virus a diferentes grupos de embriones, el tratamiento con los dos compuestos relacionados anteriormente, y concluir tanto las bondades en su aplicación, como sus efectos secundarios en el desarrollo de nuevos agentes patógenos.

4.3.1. Descripción del tratamiento con tripsina

Para realizar la descripción del tratamiento con tripsina, se deben exponer los principales elementos en cuanto a la forma en la que se aplicó el compuesto en los distintos experimentos. En este sentido, se tiene que todos los procedimientos mediante los cuales se utilizó la enzima, tuvieron su sustento en los protocolos de lavado de producción de

embriones, recomendados por (IETS, 2003). Y siguiendo el procedimiento que se detalla en la tabla 1, del siguiente modo:

Tabla 1. Protocolos de procedimiento para el tratamiento con tripsina

Protocolo 1	Protocolo 2
<ul style="list-style-type: none"> - 5 lavados en solución salina. - Adición de buffer fosfatada (PBS), con una dosis de antibióticos. - Por un tiempo estimado de 60-90 segundos. 	<ul style="list-style-type: none"> - 0,4% de BSA-V - 2 gotas que contienen tripsina, pH. 7,6 - 7,8 - Por un tiempo estimado de 60-90 segundos.

Fuente: Elaboración propia, con base en información obtenida de Marley *et al.*, (2008), Bielanski *et al.*, (1997), Bielanski *et al.*, (2013), D'Angelo *et al.*, (2009) y Fernandes *et al.*, (2015).

Bajo estos parámetros (Marley *et al.*, 2008) utilizaron la tripsina estéril, en una solución salina balanceada de Hanks sin Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, se utiliza a una concentración de 0,25%. Luego del tratamiento con tripsina, los embriones fueron sometidos a 5 lavados en una solución PBS conteniendo antibióticos y 2% de suero. Es importante reemplazar BSA fracción V por suero en el lavado, después del tratamiento con tripsina a fin de asegurar la inactivación de la tripsina. Es de anotar que Marley *et al.*, incluyeron otros componentes adicionales a la tripsina como antibióticos y suero con los que se realizaron lavados posteriores al tratamiento con tripsina con el fin de obtener la potencialización de la eficiencia de la tripsina.

Para desinfectar los embriones, Bielanski *et al.* (2013), recurrieron a la utilización de tripsina, transfiriéndolos de medio de fecundación (aproximadamente 5ml) en tubos cónicos de 15 ml, cuyo contenido era 1 ml de tripsina. Acto seguido, se agitaron con vórtex durante 90 segundos; añadieron y mezclaron un volumen igual de la ECS (BHV-1 y anti-

BHV-1 libre de anticuerpo). Posteriormente, se transfirieron a una placa de Petri que contiene PBS con 10% ECS, liberado mediante pipeteo de restos de células de la granulosa restante unido a la zona pelúcida (ZP), y luego se lavaron cinco veces en el mismo medio antes de ser ensayada. De igual manera, Bielanski *et al.* (2013) establecieron procedimientos de infección del Herpesvirus bovino BHV-1, a un grupo de embriones, los cuales fueron asignados en grupos experimentales del siguiente modo: 1) un grupo de embriones infectados con BHV-1, fueron lavados con tripsina de origen animal; 2) los embriones restantes, se les aplicó el tratamiento con el compuesto de tripsina recombinante; y 3) un grupo de estos embriones, no fueron sometidos a ningún tipo de lavado.

De acá, Bielanski *et al.* (2013) obtuvieron resultados bastante significativos, desde el punto de vista, del objetivo de esta revisión bibliográfica, ya que el 0% de los embriones lavados con tripsina de origen porcino, resultó positivo para el virus. Caso contrario ocurrió con el lavado a base del compuesto recombinante TrypLETM, donde cerca del 16% de las muestras, fueron positivos para el aislamiento del virus, luego del procedimiento. Estos resultados sugieren, que la Tripsina de origen porcino tiene un efecto definitivo en cuanto a la eliminación total del agente viral de los embriones se refiere, como lo mencionan Bielanski *et al.* Por el contrario, los mismos resultados se encargan de presentar una respuesta menos eficiente al emplear el compuesto recombinante TrypLETM, caso en el cual no se consigue la eliminación total del virus, lo cual puede sugerir cierta resistencia del Herpesvirus bovino-1 a este compuesto o cuando menos revela un grado menor de eficiencia al ser utilizado como agente inactivador del virus, ya que en el 84% de los casos se logró aislar el virus.

Un mismo procedimiento fue realizado por Makarevich *et al.* (2007), en donde los embriones fueron expuestos a Herpesvirus-1 (BHV-1) a $10^{6,16}$ TCID₅₀/ml durante 60

minutos, en una atmósfera que contiene 5% de CO₂. Seguidamente, estos fueron lavados en tripsina, del siguiente modo: 1) *los primeros cinco, los últimos cinco lavados en PBS suplementado con penicilina, estreptomicina y BSA fueron intercalados, para que posteriormente 2) la sexta y séptima lavadas, que estaban en solución salina Hank's equilibrada sin Ca²⁺ + y Mg²⁺ + más Tripsina estéril (1:250).* Después del lavado, los embriones se incubaron durante 48 horas en el fluido del oviducto sintético (SOF) con BSA. Los resultados evidenciaron que, luego del lavado con tripsina y 48 horas después de la inoculación del virus, sólo el 7,8% de los embriones se desarrollaron a blastocistos expandidos, el 9,8% a blastocistos y aproximadamente el 2% a la fase de blastocistos temprana. El resto de ellos, es decir, más del 80% de los embriones, se desarrollaron sin problema, por lo cual el estudio concluye que se logró aislar el virus en más del 80% de los embriones después del tratamiento con tripsina, constituyéndose el tratamiento con tripsina en una alternativa bastante eficiente para combatir el virus BHV-1.

En Colombia, las investigaciones referentes al aislamiento del virus BHV-1 han sido numerosas, pero por diversas complejidades que se enmarcan en la zona, no han tenido ni el alcance ni la efectividad esperada (Piedrahita *et al.*, 2009). En ese sentido, hay que prestar especial atención a procesos de experimentación realizados por miembros de la Universidad Nacional, en donde se ha utilizado esta enzima para hacer la titulación química del virus; Betancur *et al.* (2006) lograron desprender las células confluentes de MDBK con tripsina al 0.25% para obtener 10 ml de células en MEM al 2%, a una concentración de 500.000 cel/ml, incubadas a 37°C por 72 h, con el fin de evidenciar la reproducción de la enfermedad a partir de propiciar la infección en bovinos negativos con una cepa de BHV-1, especialmente por la vía genital, que representa una mayor capacidad infecciosa.

4.3.2. Procedimientos para el uso de la tripsina con el fin de combatir el Herpesvirus Bovino tipo 1 (BHV-1) y resultados

El uso de tripsina en este tipo de procedimientos, tiene su punto de partida con Stringefellow *et al.* (1990), en donde se llevó a cabo un proceso de experimentación en el cual los embriones fueron expuestos a 10^6 a 10^7 PFU de BHV-1 durante 1 a 2 horas. Dentro de los aspectos más representativos de la investigación, hay que decir que se tomaron los 12 embriones fertilizados in vitro, exponiéndolos al virus; para concluir con la realización de lavados a todos los embriones examinados para determinar la presencia del virus inoculado con anterioridad. Para el procedimiento se usó una concentración de 0,25% de tripsina en solución salina balanceada, por un tiempo de 120 a 150 segundos, con una temperatura que no superaba los 27° C. Los procedimientos de lavado embrionario realizados con tripsina de origen animal en este experimento de Stringefellow *et al.* (1990), permitieron determinar que luego del séptimo lavado, en 6 grupos de 29 embriones cada uno, se logró aislar satisfactoriamente el virus; y aunque se detectó un promedio de 2 PFU de virus, no existen argumentos para desconocer la eficiencia de este tratamiento para la eliminación de este herpesvirus.

Seguidamente, Bielanski *et al.* (1997), evaluó la eficiencia de la tripsina en la desinfección de embriones, expuestos al BHV-1. La experimentación llevó a que los embriones FIV, fueran expuestos al BHV-1 durante maduración in vitro. Se aplicó tripsina porcina a una concentración de 0,25% (por aproximadamente 90 segundos) para desinfectar los embriones, 18 horas después de la inseminación o en el día 7 a los embriones resultado de infección. En total, no fueron detectados virus en el 71% de las muestras expuestas al BHV-1 y tratados con tripsina porcina. Este resultado del tratamiento descrito a base de

tripsina, demuestra que la tripsina porcina es eficiente en el tratamiento de agentes, que se adhieren con firmeza a la zona pelúcida pero que, sin embargo, la eliminación con procedimientos de lavado estándar, resulta insuficiente, por cuanto el 29% de los embriones conservaron el virus.

Así mismo, Makarevich *et al.* (2007) encontraron que la exposición al BHV-1 perjudica el desarrollo embrionario, independientemente de que sean o no tratados con tripsina. Se logró determinar, luego del análisis de inmunofluorescencia, la presencia de partículas de BHV-1 en aproximadamente el 75% de los embriones que fueron tratados con tripsina y en todos los embriones microinyectados con BHV-1, se reveló la presencia de partículas virales en el interior de las células expuestas. El análisis TEM detectó partículas virales adheridas a los poros de la ZP; mostrando la presencia de partículas de BHV-1 y alteraciones ultraestructurales en los organelos celulares. Estos resultados indican que el mejor tratamiento que debe existir en el aislamiento del virus BHV-1 es la prevención del contagio, considerando que apenas en un 25% de los embriones infectados con el virus y posteriormente tratados con tripsina, se logró evitar la presencia de partículas virales. El estudio resalta que la exposición al BHV-1 trae consecuencias negativas en el desarrollo de los embriones y es por ello que se hace necesario mejorar las prácticas biotecnológicas en cuanto a su cuidado e higiene.

También Marley *et al.* (2008), evaluaron un tratamiento, utilizando TrypLETM, en grupos de embriones -con la zona pelúcida intacta- derivados y fecundados de manera artificial, los cuales fueron expuestos al BHV-1 durante 1 h. Para evaluar la eficiencia, de dicho tratamiento, se efectuó un lavado, acorde al procedimiento (IETS, 2003 y diluyendo 2,5%

de tripsina (Invitrogen)⁶ en solución salina equilibrada de Hanks (BSS) sin calcio y magnesio (Invitrogen) para una concentración de 0,25%, durante 5 y 10 minutos. Como resultado se obtuvo una seronegatividad del virus en el 65% de los casos. Es de resaltar que si bien no se consiguió la eliminación total del virus, el uso de la tripsina se realizó sin una secuencia de lavados sino con apenas un único lavado y con un tiempo máximo de tan solo 10 minutos, por lo cual podría considerarse que en esas condiciones, se tiene un resultado que bien vale la pena considerar en el esfuerzo de aislar el virus de los embriones infectados.

En el año siguiente, la investigación realizada por D'Angelo *et al.* (2009), tuvo como principal objetivo el evaluar la eficacia del tratamiento con tripsina sobre la inactivación del BHV-1 in vitro producido por fertilización y embriones bovinos artificialmente infectados. El diseño experimental de este estudio permitió clasificar dos grupos de estudio: 1) Un grupo de control que no se expuso a ningún virus ni tratamiento y 2) aquellos embriones sometidos a lavados secuenciales o al tratamiento con tripsina de acuerdo con las directrices de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS).

Dentro de los aspectos mas relevantes que se pudieron recopilar de los resultados obtenidos, radica en la evaluación de los dos métodos de lavado al que se sometieron los embriones, luego de ser inoculados por el BHV-1. En estos términos, se pudo determinar que en el 86% de los embriones expuestos, tratados con tripsina, se logró eliminar el virus de manera efectiva. Del mismo modo, fue posible constatar que después de las 10 repeticiones, el 81% (1692/2090) de los presuntos cigotos escindidos y el 40% (836/2090)

⁶ Que para este experimento fue la misma TrypLE™ adquirida a través de los medios de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.).

se desarrollaron para producir 836 blastocistos intactos de zona pelúcida (D'Angelo *et al.*, 2009).

Por otro lado, Sabini *et al.* (1996) sometieron el virus a la acción de la tripsina, mediante la realización de una prueba de resistencia, en la cual se mezclaron volúmenes iguales de líquidos infectivos conteniendo 1×10^{10} DICC₅₀/ml con una solución de tripsina estéril (Difco 1:250), hasta lograr una concentración total del medicamento de 5 mg/ml. Las mezclas fueron incubadas en baño termostatzado a 37°C por 15, 30, 45 y 60 minutos; demostrando una pérdida de inefectividad a medida que se incrementó el tiempo y la temperatura de exposición. Otra perspectiva se puede dilucidar desde el punto de la evaluación del impacto que pueden tener variables como el tiempo de exposición, la temperatura y la tripsina, sobre la efectividad a la hora de combatir el BHV-1 en procesos de experimentación. Estas conclusiones, fueron el resultado de la anterior investigación realizada por Sabini *et al.* (1996), en donde lograron determinar una efeciencia creciente en relación a la termosensibilidad del virus; evidenciando una correlación directa entre las variables temporales y térmicas y el aumento en la pérdida de inefectividad del virus.

Esta experimentación lleva a concluir que un tiempo mayor de exposicion del virus, al uso de tripsina, representa una reducción de la virulencia de la cepa que ataque al embrión, en la misma proporción que la exposición del calor a 50°C por 60 minutos. Se observa igualmente que a la concemtración de tripsina empleada hay un descenso de 1 U. log. con una exposición de 15 minutos y a los 30 minutos 2 U. log, no detectándose inefectividad a tiempos de 45 y 60 minutos (Sabini *et al.*, 1996); recalcando la eficiencia de este tratamiento a la hora de combatir el BHV-1, al combinar la acción de los lavados, con el uso de la tripsina y con el aumento de la temperatura, constituyéndose en un tratamiento altamente letal para el virus.

También es válido presentar los resultados obtenidos por Fernandes *et al.* (2015), en donde se tomaron 20 embriones, cada uno de ellos fecundados in vitro, y divididos en un grupo sin exposición a BHV-1 (grupo de control) y otro expuesto al BHV-1. Luego de 24 horas, se realizaron dos lavados en PBS de Dulbecco (Gibco TM) con BSA al 0,4%, penicilina G (100 UI / ml), estreptomicina (100 μ g / ml) y anfotericina (0,25 μ g / ml). Posteriormente, se realizaron otros dos lavados con tripsina al 0,25% (Gibco TM) en solución salina equilibrada de Hank (Gibco TM) durante un total de 60 a 90 segundos de exposición y después cinco lavados adicionales que eran idénticos a los cinco primeros. Todos los grupos se inocularon en monocapa confluyente de células MBDK y se incubaron a 38°C en una atmósfera de CO₂ al 5% aire humidificado. Del anterior tratamiento realizado por Fernandes *et al.* (2015), con un total de 9 lavados, se tuvo como resultado que los embriones bovinos (de 16 células al estadio de blastocisto) con ZP intacta que habían estado expuestos a BHV-1 durante 24 horas no mostraron infección embrionaria, pero el virus se recuperó de la mayoría de estos embriones incluso después de un extenso procedimiento de lavado. Estos hallazgos dejan entrever que aunque la ZP es una barrera eficaz para BHV-1, el virus puede adherirse a esta estructura. En consecuencia, se puede entrever que por sí sola la ZP no logra contener al virus por periodos mayores a 24 horas, lo que sugiere que deben tratarse los embriones con algún agente antiviral para lograr una mayor eficiencia a un plazo mayor que un día.

Algo que contrasta con esta eficiencia relativa, tiene que ver con algunos de los resultados obtenidos también por por D'Angelo *et al.* (2009), en el cual, los embriones producidos in vitro al día 7 y expuestos al BHV-1 fueron sometidos a lavados secuenciales, demostrando que el tratamiento con tripsina no fue capaz de eliminar el BHV-1 de los embriones, lo que sugiere una interacción entre el virus y el embrión. El potencial conocido de exposición

natural al BHV-1 y la relativa ineficiencia de los procedimientos de procesamiento de embriones (lavado y tratamiento con tripsina) crean preocupaciones legítimas de que puedan ser transmitidos con embriones expuestos. Sin embargo, no se ha determinado que la cantidad de virus infeccioso asociada con estos embriones constituiría una dosis infecciosa para receptores susceptibles a través de la vía intrauterina.

Ahora, mucho más en contravía con las dos conclusiones expuestas anteriormente, los experimentos realizados por Marley *et al.* (2008), demuestran que la eficiencia, de la RBTr, en la desinfección de BHV-1 parece ser similar a la tripsina porcina, ya que no causó enfermedades transmisión a receptores seronegativos y resultó en terneros libres de BHV-1 al nacer. Del mismo modo, en el estudio de Marley *et al.* (2008) se afirma que, si bien TrypLETM tiene un efecto antiviral, cuando se utiliza por 10 min sobre embriones, no fue totalmente eficiente, ya que este se encontró positivo para el aislamiento del virus en el 9% de los grupos estudiados.

En el mismo estudio, Marley *et al.* (2008), lograron determinar que el 12,5% de las muestras, fueron positivas para el aislamiento del virus, tras la posterior aplicación del lavado con el TrypLETM; a diferencia del procedimiento realizado con tripsina de origen porcino, en el cual no se logró aislar el virus BHV-1, en ninguno de los 18 grupos de embriones estudiados.

Este resultado muestra una eficiencia superior de la tripsina de origen animal, en cuanto a la mitigación del agente patógeno, estudiado a lo largo de este trabajo. Del mismo modo, en relación al tratamiento con tripsina porcina, se pudo determinar que de una muestra de 93 embriones previamente expuestos al BHV-1- el 29% fueron positivos para el virus, reduciendo de manera significativa ($P < 0,05$) el número de muestras positivas en

comparación con el grupo de embriones no tratados o grupos de control (Bielanski *et al.*, 1997).

Con base en las deducciones expuestas con anterioridad y haciendo énfasis en los resultados estadísticos, arrojados por las muestras analizadas; es posible determinar, una mayor eficiencia de la tripsina de origen porcino, ya que, en los experimentos mencionados, tuvo un mayor número de casos positivos, aunque no relativamente significativos, tal como se había afirmado en un principio.

CONCLUSIONES

La multiplicidad de estudios referentes a la introducción de tripsina, en tratamiento contra el virus BHV-1, hace que el espectro bibliográfico y científico, en relación al tema sean excesivamente amplios, este es un indicador claro de los altos índices de presencia del BHV-1 en hatos ganaderos, su impacto tan nocivo en la salud de los animales y la preocupación de los investigadores por darle una solución sanitaria eficiente a esta problemática.

Como primera conclusión, se pudo establecer un marco sobre el cual se desarrolló toda la revisión bibliográfica, acudiendo a determinar y exponer todos los elementos que constituyen el BHV-1, sin dejar de lado su aplicación en las biotecnologías reproductivas. Este último aspecto, que fue la razón de ser del trabajo académico, permitió conocer los inmensos efectos que tiene sobre los procesos de mejoramiento genético.

Así mismo, en relación a los efectos derivados de la enfermedad, en relación a las afectaciones físicas sobre los animales, también fue claro determinar que se propaga hacia conductos genitales y respiratorios que pueden representar la muerte de los animales, o dejarlos en condiciones no aptas para el desarrollo de un esquema de negocio que produzca rendimientos sólidos.

También es posible afirmar que la afectación de este tipo patologías, complejiza la labor pecuaria, en relación a los niveles tan elevados de contagio que se producen y, con ello, a su impacto dentro de la estructura económica. Los mecanismos de contagio y diseminación del virus, comprometen el desarrollo de las actividades del hato, ya que, se deben hacer más inversiones para su prevención y control.

Dejando de lado los aspectos económicos, la revisión permitió conocer el tratamiento con tripsina, ya sea porcina o recombinante, como el principal método para evitar que el virus llegue a producir pérdidas mayores en la salud de los animales. Fue posible determinar, con base en la revisión de procesos experimentales, la alta efectividad de ambos procesos, aunque el de origen animal, fue superior, siempre desencadena otro tipo de patologías sobre la salud de los ejemplares.

Con base en la revisión bibliográfica realizada, es posible concluir que si bien, la tripsina, muestra resultados convenientes en cuanto a la eficiencia en la disminución del BHV-1, también es claro que su efecto se potencializa cuando se combina con protocolos de lavado de embriones.

Así mismo, se puede inferir que la implementación de estos procedimientos, que usan la tripsina como principal agente en la eliminación del BHV-1, tiene bases experimentales sólidas, soportadas en más de dos décadas de investigación, y que desde sus inicios se ha demostrado como el mecanismo más eficiente a la hora de eliminar este tipo de herpesvirus de los embriones.

Por otro lado, se concluye que no existe una evidencia significativa que demuestre un mayor efecto de la RBTr TrypLETM, en comparación con la tripsina porcina, hay que los resultados denotan una similitud entre los efectos positivos que su aplicación pueda traer para desinfectar las muestras sobre las que se experimentó.

Ahora bien, si de presentar resultados se trata, se pudo obtener una eficiencia del 59% en la disminución de la infección en embriones infectados, tratados con tripsina de origen porcino, del mismo modo, se revisaron experimentos en los que su eficiencia fue absolutamente superior, lo que hace que el proceso de comparación entre los dos compuestos, se incline hacia la recomendación de esta tripsina.

Para reforzar esta aseveración, hay que sentar un punto de inflexión, en que, al parecer, la RBTr TrypLETM, fue menos potente que la tripsina de origen porcino tripsina, ya que, como se pudo concluir en el experimento de Marley *et al.* (2008), su tratamiento puede requerir un tiempo de incubación más largo para inactivar el virus, que no es práctico para el uso rutinario.

También es preciso afirmar que ambas poseen ventajas significativas en su utilización, derivadas de un proceso científico que lleva, por un lado, a que se diga que la tripsina de origen porcino, tiene una mayor validez al ser respaldada por la IETS. Por otro lado, la RBTr TrypLETM tiene la ventaja de no ser agente de otro tipo de patologías, lo que, en términos preventivos, la haría mucho más efectiva.

Por último, dejando de lado la comparación, y acudiendo al objetivo central de esta revisión, se concluye que la tripsina es un método que puede representar un potencial en la mitigación de los efectos de la patología descrita, por tanto, debe ser ejecutada bajo los parámetros descritos en varios apartados de este documento.

REFERENCIAS

- Acosta, F., Gándara, L., Ibarra, R., Pereira, M., Verdoljak, J. 2016. Impacto económico del control de mortalidad entre preñez y el destete en ganado de carne. *Revista Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA*. 40-45.
- Aguilar, Á. 1987. El Virus de la Rinotraqueitis infecciosa Bovina (Bovine Herpesvirus 1): Propiedades y vacunación. *Ciencia Veterinaria*, 161-208.
- Alberio, R. 2008. Aspectos Sanitarios de la Transferencia de Embriones. *Biología de la Reproducción*, 201 - 221.
- Astaiza, J., Benavides, J. & Díaz, J. 2012. Estudio de costo-efectividad del programa de vacunación contra *Brucella abortus* en bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, vol 41 N°2.
- Avila, M., Rodríguez, M., Díaz, H., & Barrera, M. 2008. Diagnóstico virológico de Herpesvirus bovino tipo-1 (Virological diagnostic of Bovine herpesvirus type-1). *Revista Electrónica de Veterinaria*. Disponible: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030308/030819.pdf>
- Bermúdez, V. 1998. Mejora de la ganadería mestiza de doble propósito. Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. Ediciones Astro Data S.A. 166-169.
- Betancur, C., González, M., & Reza, L. 2006. Seroepidemiología de la rinotraqueitis infecciosa. *Revista MVZ Córdoba*, 830-836.
- Bielanski, A., Simar A., Maxwell A., Nadin-Davis, A. 2001. Bovine immunodeficiency virus in relation to embryos fertilized in vitro. Disponible: <http://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC14110345/>
- Bielanski, A., Algire, J., Lalonde, A., & Garceac, A. 2013. Prevention of bovine herpesvirus-1 transmission by the transfer of embryos disinfected with recombinant bovine trypsin. *Theriogenology*, 1104-1108.
- Bielanski, A., Lutze-Wallace, C., Sapp, T., & Jordan, L. 1997. The efficacy of trypsin for disinfection of in vitro fertilized bovine embryos exposed to bovine herpesvirus 1. *Animal Reproduction Science*, 1-8.

- Brock K. 1998. Quality control for materials of animal origin used in embryo production and transfer. In: Stringfellow DA, Seidel M, editors. Manual of the International embryo transfer Society. Savoy, IL: IETS; p. 135–139.
- Byrne, K. M., Horohov, D. W., & Kousoulas, K. G. 1995. Glycoprotein B of Bovine Herpesvirus-1 Binds Heparin. . *Virology*, 230-235.
- Castellanos, A. (2007). Evaluación del desempeño reproductivo de hembras Brahman de exposición en Colombia. Revista de investigación Vol. 7 N°001. Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia. 133-139.
- D'Angelo, M., Visintin, J., Richtzenhain, L., & Goncalves, R. 2009. Evaluation of Trypsin Treatment on the Inactivation of Bovine Herpesvirus Type 1 on In Vitro Produced Pre-implantation Embryos. *Reprod Domest Anim*, 536-539.
- El Azhary, M., Lamothe, P., & Silim, T. 1980. Bovine herpesvirus in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1789830/pdf/canvetj00313-0020.pdf>
- Fauquet, M., Mayo, M., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. 2005. Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Londres, Reino Unido.
- Fedegán. 2014. Inventario II ciclo de vacunación 2014. Subgerencia de Salud y Bienestar.
- Fernandes, R.; Martins, R.; Barroso, C.; Richtzenhain, L.; Visintin, J; D'Angelo, M. 2015. In vitro interaction of bovine herpesvirus 1 with uterine tube epithelial cells and oocytes. *Animal Pathology*, 1-6.
- Filipiak, Y., & Larocca, C. 2012. Biotecnología en Reproducción Bovina. Disponible: <http://www.fvet.edu.uy/>: <http://www.fvet.edu.uy/sites/default/files/biotecnolog%C3%ADa/20120813%20prot%20TE%20FIV%20Criop.pdf>
- Houe, H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (DVB) infections. *Vet. Microbiology*. 64, 89-107.
- Larocca, C.; Calvo, J; Lago, I; Crispo, M; Rosés, G; Viqueira, M. 2004. Diferentes fuentes de licor folicular en el desarrollo in vitro de embriones bovinos. Archivos de zootecnia, v.: 53 203, p.: 329 - 332.
- Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud, IETS. 2011. Disponible: http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2011.pdf

- Lesko, J., Veber, P., Hrdá, M., & Feketeová, M. 1993. Large-scale production of infectious bovine rhinotracheitis virus in cell culture on microcarriers. *Acta Virologica*, 73-78.
- Machaty, Z. 2012. Producción y Manipulación de Embriones Bovinos. *Theriogenology*, 937-950.
- Makarevich, A., Pivko, J., Kubovicova, E., Chrenek, P., Slezakova, M., & Louda, F. 2007. Development and viability of bovine preimplantation embryos after the in vitro infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultrastructural studies. *Zygote*, 307-315.
- Marley, D., Givens, D., Galik, P., Riddell, P., & Stringfellow, A. 2008. Efficacy of a recombinant trypsin product against bovine herpesvirus 1 associated with in vivo- and in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 746–757.
- Martinez, P., & Riveira, I. 2008. Antecedentes, generalidades y actualización en aspectos de patogénesis, diagnóstico y control de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) . Bogotá D.C, Colombia.
- McVicar, J., Singh, E., Mebus, C., & Hare, W. 1986. Embryotransfer as a means of controlling the transmission of viral infections. *Theriogenology*, 595-601.
- Mellisho, E. 2007. Manual de Inseminación Artificial en Ganado Ovino. 1era Edición. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Murphy, F. A.; Gibbs, E. P. J.; Horzinek, M. C. y Studdert, M. J. 1999. Veterinary Virology, Third Edition.
- OEI. 2010. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Paris, Francia.
- Palma, G. 2008. Biotecnología de la reproducción: Ciencia, Tecnología y Sociedad. Disponible: http://www.reprobiotec.com/libro_verde/cap_01.pdf
- Pidone, C., Galosi, C., & Etcheverrigaray, M. 1999. Herpesvirus bovinos 1 y 5. *Analecta veterinaria*, 40-50.
- Piedrahita, L., Montoya, L., & FranciscoPedraza. 2009. Herpes Virus Bovino tipo 1 (BoHV-1) como posible causa de encefalitis en bovinos de la región del Magdalena Medio Colombiano. Estudio serológico y análisis epidemiológico. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 191-198.
- Restrepo, G. 2008. Biotecnologías Reproductivas Aplicables a la Producción Bovina en Colombia. Grupo de investigación en biotecnología animal – GIBA. Politécnico Colombiano

Jaime Isaza Cadavid. Medellín. Disponible:
https://www.researchgate.net/profile/Giovanni_Restrepo/publication/233906494_Biotecnologias_Reproductivas_Aplicables_a_la_Produccion_Bovina_en_Colombia/links/0deec5288043b9f6a100000/Biotecnologias-Reproductivas-Aplicables-a-la-Produccion-Bovina-en-Colombia.pdf

Rivera, M. G. 2013. Manual de Biotecnología Reproductiva. Disponible:
<http://manualbiotecnologiareproductiva.blogspot.com.co>:
<http://manualbiotecnologiareproductiva.blogspot.com.co/p/evolucion-de-la-biotecnologia.html>

Rodríguez, M., Vallejo, A., Batista, P., & Espasandin, A. C. 2011. Biotecnologías reproductivas aplicadas a la mejora genética animal. *Cangüe*, 44-52.

Romero, J.R., Villamil, L.C., Pinto, J.A. 1999. Impacto económico de enfermedades animales en sistemas productivos en Sudamérica: estudios de caso. *Revistas Scientific and Technical Review*, 498-511.

Ruiz, J., Osorio, J. y Vera, V. 2012. Desarrollo de un poxvirus recombinante que expresa la glicoproteína D del herpesvirus bovino-1. *Acta Biológica Colombiana*, 17(3), 511-524.

Sabini, L., Ceriatti, F., Ramos, B., & Zanon, S. 1996. Sensibilidad al calor y la tripsina del virus herpes suis, cepa rc/79. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 159-163.

Stringfellow, D; Lauerman, L; Nasti, K; Galik, P. 1990. Trypsin treatment of bovine embryos after in vitro exposure to infectious Bovine Rhinotracheitis Virus and Bovine Herpes Virus-1. *Theriogenology*, 331.

Stringfellow D.A. 1998. Recommendations for the sanitary handling of in-vivo-derived embryos. In: Stringfellow DA, Seidel SM (eds), Manual of the International Embryo Transfer Society, 3rd edn. IETS, Savoy, IL, pp. 79–96.

Stringfellow D.A, Givens M.D, Waldrop J.G. 2004. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reproduction Fertility Development*, 16: 93-102.