

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS**  
**NATURALES**

**CARRERA: MEDICINA VETERINARIA**



**TÍTULO: EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS**  
**OVOCITOS ANTES Y DESPUÉS DE LA CRIOCONSERVACIÓN, SEGÚN**  
**LA EDAD DE BOVINOS DE MATADERO.**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**AUTOR: Jefferson Elías Burgos Enríquez**

**DIRECTORA: MVZ. Paola Jael Lascano Armas**

**LATACUNGA, ABRIL 2015**

## **AUTORÍA**

Yo, Jefferson Elías Burgos Enríquez, declaro que el trabajo aquí descrito, la responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis son de mi autoría y que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica de Cotopaxi puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

.....

**CARTA DE APROBACIÓN**  
**DE LA DIRECTORA DE TESIS**

En mi calidad de Directora de Tesis titulada: **“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS ANTES Y DESPUÉS DE LA CRIOCONSERVACIÓN, SEGÚN LA EDAD DE BOVINOS DE MATADERO.** Propuesta por el egresado Jefferson Elías Burgos Enríquez como requisito previo a la obtención del Título de Médico Veterinario Zootecnista, de acuerdo con el Reglamento de Títulos y Grados, considero que el trabajo mencionado reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

.....  
MVZ. Paola Lascano  
DIRECTORA DE TESIS  
Latacunga, Abril del 2015

**CARTA DE APROBACIÓN**

**DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL**

**“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS  
ANTES Y DESPUÉS DE LA CRIOCONSERVACIÓN, SEGÚN LA EDAD  
DE BOVINOS DE MATADERO”.**

Fue revisado por:

.....  
DRA. BLANCA MERCEDES TORO MOLINA  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....  
PhD. VOLODYMYR DROBCHAK DROBCHAK  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....  
DRA. PATRICIA MARCELA ANDRADE AULESTIA  
OPOSITOR

## **AGRADECIMIENTO**

*Dedico este proyecto de tesis a Dios y a mis padres. A Dios porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar; a mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento.*

*A la Universidad Técnica de Cotopaxi, en particular a la Facultad de Medicina Veterinaria, a los Docentes que impartieron sus conocimientos con el afán de enriquecer el saber científico que debía conocer.*

***Jefferson Elías Burgos Enríquez***

## DEDICATORIA

La concepción de este proyecto está dedicada a Dios y mis padres, pilares fundamentales en mi vida. Sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar; a mis hermanas por su apoyo y cariño incondicional; a mi abuelita Emerita por brindarme su apoyo y cariño sublime. También dedico este proyecto a mi novia, compañera inseparable de cada jornada. A ellos este proyecto, que sin ellos, no hubiese podido ser.

*Jefferson Elías Burgos Enríquez*

## ÍNDICE

Portada	i
Declaración expresa del autor	ii
Aval de la Directora de Tesis	iii
Carta de aprobación de los miembros del tribunal	iv
Agradecimiento	v
Dedicatoria	vi
Índice de Contenidos	vii
Resumen	xii
Abstract	xiii
Introducción	xv
Hipótesis	xv
Objetivos	xv

## CAPÍTULO I

1.1.	Antecedentes	1
1.1.1.	Ciclo estral bovino	1
1.1.1.1.	Fase folicular o regresión lútea (proestro)	2
1.1.1.2.	Fase preovulatoria (estro – metaestro)	2
1.1.1.3.	Fase luteal (diestro)	3
1.1.2.	Madurez sexual	4
1.1.3.	Ovogénesis	4
1.1.4.	Foliculogenesis	5
1.1.5.	Extracción de ovocitos	6
1.1.6.	La crioconservación	7
1.1.7.	La calidad de los ovocitos	10
1.1.7.1.	Características morfológicas de los ovocitos	12
1.1.7.2.	Cultivo de los ovocitos	14

## CAPÍTULO II

2.	Materiales y métodos	18
2.1.	Características del lugar	18
2.2.	Materiales	19
2.2.1.	Materiales de oficina	19
2.2.2.	Recursos tecnológicos	19
2.2.3.	Materiales de laboratorio	19
2.2.4.	Materiales de campo	20
2.2.5.	Material biológico	20
2.3.	Tipo de investigación	20
2.3.1.	Investigación experimental	20
2.3.2.	Investigativa Descriptiva	20
2.4.	Métodos	21
2.4.1.	Método deductivo	21
2.4.2.	Método científico	21
2.5.	Unidad de estudio	21
2.6.	Variables evaluadas	21
2.6.1.	Calidad de los ovocitos	21
2.6.2.	Madurez de ovocitos	22
2.7.	Manejo de ensayo	22
2.7.1.	Recolección de ovarios de hembras bovinas faenadas	22
2.7.2.	Selección de ovocito	23
2.7.3.	Selecciones de ovocitos	23
2.7.4.	Crioconservación de ovocitos	24
2.7.5.	Descongelación de ovocitos	24



### **CAPÍTULO III**

3.	Análisis de resultados	25
3.1.	Resultados obtenidos de los ovocitos de cada ovario.	25
	CONCLUSIONES	33
	RECOMENDACIONES	34
	BIBLIOGRAFÍA	35
	ANEXOS	37

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico No. 1	Fase preovulatoria (estro – metaestro).	3
Gráfico No. 2	Esquema de desarrollo de los folículos ováricos.	16
Gráfico No. 3	Microfotografías de un corte de ovario I.	16
Gráfico No. 4	Microfotografías de un corte de ovario II.	17
Gráfico No. 5	Microfotografías de un corte de ovario III.	17
Gráfico No. 6	Porcentaje general de ovocitos por categorías de calidad.	27
Gráfico No. 7	Porcentaje de ovocitos por categorías según la edad.	28
Gráfico No. 8	Porcentaje de ovocitos por categorías de madurez	29
Gráfico No. 9	Porcentaje de ovocitos por categorías según la edad	30
Gráfico No. 10	Resultado de la verificación de los ovocitos de categoría 1, según su calidad y madurez	31

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1	Clasificación de los ovocitos.	14
Tabla No. 2	Resultados generales de la calidad de los ovocitos por categorías.	26
Tabla No. 3	Resultados de la calidad de ovocitos recolectados por categorías según los G1, G2, G3.	27
Tabla No. 4	Resultados de la madurez de ovocitos recolectados de la categoría I.	29
Tabla No. 5	Resultados de la madurez de ovocitos recolectados por categorías según los G1, G2, G3.	30
Tabla No. 6	Resultado de la crioconservación de los ovocitos de categoría 1, según su calidad y madurez.	31

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Fotos de la Práctica en el Laboratorio del CEYPSA.	37
----------	---	----

**TEMA:** “Evaluación de las características de los ovocitos antes y después de la crioconservación, según la edad de bovinos de matadero”.

## **RESUMEN**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción en el Centro de Experimentación y Producción Salache “CEYPSA”, de la Universidad Técnica de Cotopaxi, cuyo tema: EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS ANTES Y DESPUÉS DE LA CRIOCONSERVACIÓN, SEGÚN LA EDAD DE BOVINOS DE MATADERO.

El objetivo principal de la presente investigación fue Evaluar las características de los ovocitos según la edad de bovinas de matadero mediante un laboratorio de biotecnología CEYPSA de reproducción para evidenciar su funcionalidad. Para ello se recolectaron ovarios de vacas de matadero recolectados en el camal de Saquisilí, las cuales fueron clasificadas en tres grupos, Grupo 1 (2 a 3 años), Grupo 2 (6 a 7 años), Grupo 3 (10 a 11 años).

El procedimiento realizado con 30 ovarios correspondientes a 15 bovinas hembras y se obtuvo 217 ovocitos equivalente al 100% de los cuales se clasificó según la edad de las hembras bovinas, en el Grupo 1 95 ovocitos en donde 75 son categoría I en el parámetro calidad; en el Grupo 2 70 ovocitos con 47 de calidad I y en el Grupo 3 con 52 ovocitos, pero de estos 34 calidad I, por tanto en el parámetro calidad se obtiene de 156 ovocitos. Evidenciando que en la juventud los ovarios presentan más actividad folicular y más ovocitos que en animales maduros.

De acuerdo a la práctica realizada en el Laboratorio CEYPSA, se determinó y se recomienda que las bovinas reproductoras de 2 a 3 años de edad, sean los ejemplares más óptimos para recolectar ovocitos para obtener nuevas crías con características genéticas similares y de calidad teniendo en cuenta que luego de ser adecuadamente crioconservados no sufren alteración alguna.

## SUMMARY

This research was conducted at the Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción en el Centro de Experimentación y Producción Salache "CEYPSA" Technical University of Cotopaxi, whose theme: EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS ANTES Y DESPUÉS DE LA CRIOCONSERVACIÓN, SEGÚN LA EDAD DE BOVINOS DE MATADERO.

The main objective of this research was to evaluate the characteristics of oocytes by age of bovine slaughterhouse by a biotechnology laboratory CEYPSA play to demonstrate its functionality. To do slaughterhouse cows ovaries collected at the slaughterhouse Saquisilí, which were classified into three groups, T1 (2-3 years), T2 (6-7 years), T3 (10-11 years) were collected.

The procedure performed with 30 ovaries corresponding to 15 females and 217 bovine oocytes was obtained equivalent to 100% of which was classified by age of bovine females, oocytes in Q1 95 where 75 are category I in the quality parameter; 70 on T2 quality oocytes with 47 I and 52 oocytes T3, but quality of these 34 I, therefore the quality parameter is obtained from 156 oocytes. Which shows that youth have more follicular ovarian activity and therefore more mature oocytes in animals?

According to the practice done in the CEYPSA Laboratory, was determined and recommended that breeding cattle from 2-3 years of age, are the best specimens to collect oocytes for new offspring with similar genetic characteristics and quality considering that after being properly cryopreserved not suffer any alteration.

## INTRODUCCIÓN

En los bovinos, el proceso reproductivo constituye la esencia de la renovación biológica al igual que en todas las especies de seres vivos. Para ello es necesaria una alta eficiencia reproductiva como requisito básico para lograr el éxito económico de la ganadería sea de leche, carne o doble propósito.

La baja eficiencia de las hembras reproductoras significa mermas importantes en los rendimientos de producción lechera e, indirectamente en la producción de terneros destetados en cada ciclo reproductivo por año.

El proceso reproductivo es regulado directamente por el sistema endocrino, el cual a la vez es fuertemente influenciado por las condiciones de salud, alimentación, ambiente, enfermedades y otros factores que inciden en la vida de la reproductora (vaca o vacona).

A lo largo de la vida reproductiva de la hembra (vaca o vacona) es importante llevar registros de los parámetros reproductivos, los cuales permitan determinar cuándo reemplazarlas, número de periodos de producción lechera y los rendimientos lácteos. Todo ello requiere de un rápido crecimiento hasta la pubertad, procrear crías viables, producción láctea importante que permita alimentar la cría y vender al mercado generando ingresos al propietario del hato ganadero, y volver rápidamente al estro para continuar la vida reproductiva y productora de leche.

La hembra rumiante (vacona) alcanza la pubertad cuando presenta el primer comportamiento de estro, el mismo que va acompañado de la ovulación y maduración del cuerpo lúteo en el ovario de nueva reproductora (vacona). Dicha condición se determina por el genotipo, tamaño y peso del animal (que oscila entre el 55 al 60% del peso total que alcanzarán en la edad adulta) (factores endógenos), estación del año de nacimiento, época de lluvias, tipo de nutrición, temperatura ambiental de la región o localidad, fotoperiodo, método de crianza y

las enfermedades a las cuales ha estado expuesta la reproductora (factores exógenos).

En reproductoras adultas, el ciclo estral tiene una duración promedio de 21 días y está conformado por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. Dichas fases deben ser generadas en la madre reproductora en forma periódica, y que además debe contar con procesos reproductores sanos y óptimos a fin de lograr hatos ganaderos con niveles de reproducción destacados y que permitan satisfacer los requerimientos del mercado de cárnicos y lácteos de la región y el país.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar las características de los ovocitos según la edad de bovinas de matadero mediante un laboratorio de biotecnología CEYPSA de reproducción para evidenciar su funcionalidad.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la calidad de ovocitos según la edad de hembras bovinas del camal, mediante la identificación de estructuras para observar su funcionalidad.
- Analizar la madurez de los ovocitos en las diferentes edades mediante la compactación de membranas para evidenciar la aptitud de fertilización.
- Evaluar las características de calidad en ovocitos descongelados de hembras evaluadas en las diferentes categorías de edad mediante microscopia para determinar su viabilidad post descongelado.

## **HIPÓTESIS**

**H0:** La factor edad incide en la calidad, cantidad y madurez de los ovocitos.

**H1:** El factor edad no incide en la calidad, cantidad y madurez de los ovocitos.



# **CAPÍTULO I**

## **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

En el capítulo uno de la investigación de tesis, se detallan los fundamentos teóricos que fortalecen la propuesta de estudio.

### **1.1. Antecedentes**

Cuando la hembra bovina alcanza la pubertad manifiesta cambios rítmicos en su conducto sexual (receptividad sexual), denominada celo o estro. Los acontecimientos que comienzan en un celo y finalizan en el siguiente reciben el nombre de ciclo estral. El ciclo estral bovino tiene una duración promedio de 21 días y se produce en forma continua a lo largo de todo el año, por lo que se clasifica a las hembras bovinas como poliéstricas continuas. (Palma, Gustavo, 2011)

El conocimiento de los mecanismos involucrados en el control del ciclo estral (de la ovulación, de la función luteal, de la dinámica folicular) dan las bases para comprender y establecer métodos eficientes de sincronización del celo, como así también los tratamientos que aumenten el número fisiológico de ovulaciones. (Ricardo, A. et al , 2010)

#### **1.1.1. Ciclo estral bovino**

El ciclo estral está regulado por una interacción hormonal controlado por el eje hipotálamo – hipófisis – ovario – útero. Cada ciclo estral consiste de una relativa corta fase folicular y una más larga llamada fase luteal.

Las fases del ciclo estral se dividen en tres:

- 1) Fase folicular o de regresión lútea (proestro).
- 2) Fase periovulatoria (estro y metaestro).
- 3) Fase luteal (diestro). (Barros, C. M., 2012)

### **1.1.1.1.Fase folicular o regresión lútea (proestro)**

Este periodo tiene una duración de 3 días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y finaliza con la manifestación de celo. Al producirse la destrucción del cuerpo lúteo tenemos una caída en los niveles de progesterona y posteriormente una pérdida de tejido luteal, siendo la  $PGF2\alpha$  de origen uterino el principal luteolítico en los animales domésticos y en la mayoría de los roedores. Como consecuencia de la caída de los niveles de progesterona, disminuye el feed back, negativo que dicha hormona tenía a nivel hipolámico y comienza a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) y se estimula el crecimiento folicular con el desarrollo de un gran folículo y el aumento en los niveles de estradiol. Cuando los estrógenos alcanzan cierto nivel, se estimula la receptividad al macho y comienza el periodo de celo. (Arteche, Et al., 2013)

### **2.1.1.2. Fase preovulatoria (estro – metaestro)**

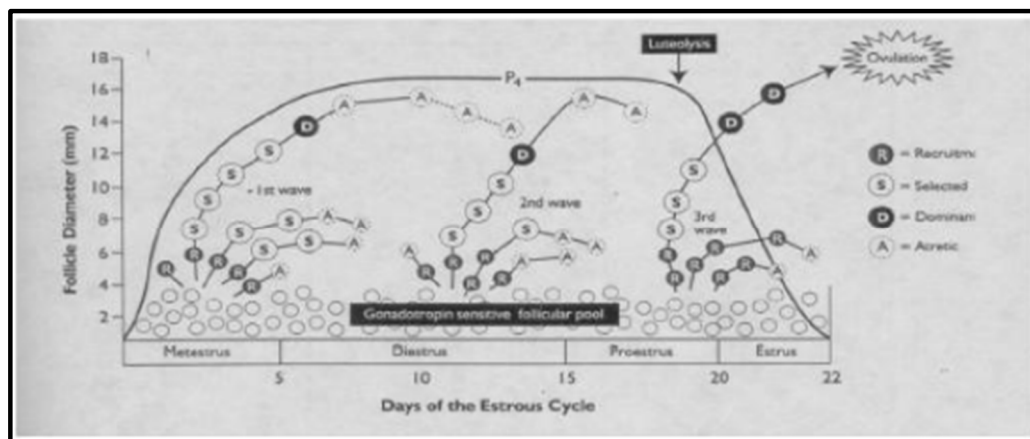
La fase comienza con la receptibilidad al macho, lo cual involucra los cambios que permitan la ovulación y el comienzo de la formación del cuerpo lúteo.

Durante el estro, cuya duración es de  $18 \pm 6$  horas, periodo en el que la vaca manifiesta inquietud, ansiedad, brama con frecuencia y pierde el apetito; en el caso de vacas lecheras, se reduce la producción láctea. Las hembras reproductoras presentan descarga de mucus con mínima viscosidad (filante), cuyo olor atrae y excita al toro por presencia de feromonas, edema de vulva y en el útero se produce un aumento del tono miometrial, detectando fácilmente por palpación transrectal. Durante dicha fase, los estrógenos en altas concentraciones alcanza el umbral de estimulación del centro cíclico hipotalámico, estimulando a las neuronas hipotalámicas a producir el pico de GnRH y en consecuencia el pico de LH. Con respecto a la FSH, disminuye su secreción, consecuencia del feed back negativo estrogénico y de la inhibina, con excepción del momento en que se produce el pico preovulatorio de LH, en que puede aparecer un pico de FSH. Posteriormente, 4 a 12 horas después de la onda de LH, se incrementan la concentración basal y la amplitud de los pulsos de FSH, relacionándose esto con la primera onda de crecimiento folicular. (Bo, G., 2012)

Luego de 12 a 24 horas de comenzado el celo, el sistema nervioso de la vaca se torna refractario al estradiol y cesan todas las manifestaciones psíquicas del mismo. El periodo inmediato a la finalización del celo, es el metaestro (6 días). En este periodo ocurre la ovulación de la vaca, a diferencia de las otras especies que lo hacen durante el celo, y comienza la organización celular y desarrollo del cuerpo lúteo. La ovulación ocurre 28 a 32 horas de iniciado el celo y es desencadenada por el pico preovulatorio de LH. A la ovulación sigue hemorragia profunda y el folículo se llena de sangre convirtiéndose en cuerpo hemorrágico. En la formación del cuerpo lúteo (luteinización) se producen una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que permiten que las células foliculares se transformen en células luteales, cambios que finalizan al séptimo día con un cuerpo lúteo funcional. (Bo, G., 2009)

**Gráfico No. 1**

**FASE PREEVULTARIA (estro – metaestro)**



Fuente: Senjer 1997. Adaptado de Lucy et al, 1992

**2.1.1.3. Fase luteal (diestro)**

Esta fase se caracteriza por el dominio del cuerpo lúteo. El mantenimiento del cuerpo lúteo, así como la síntesis de progesterona está ligada a la hormona LH que es progesterotrófica y luteotrófica.

Otras hormonas que intervendrían en la síntesis de progesterona son la FSH y la PG12. La FSH se uniría a receptores ubicados en el cuerpo lúteo y provocaría un aumento en la secreción de progesterona. En lo referente a la PGF2 $\alpha$ , además de estimular a las células

luteales para producir progesterona, aumentaría el flujo sanguíneo a nivel ovárico con el efecto positivo que esto significa sobre la síntesis y secreción de progesterona. Si el ovulo no es fecundado, el cuerpo lúteo permanece funcional hasta el día 15 al 20, después del cual comienza a regresionar en preparación para un nuevo ciclo estral. (Arteche, Et al., 2013)

### **1.1.2. Madurez sexual**

El desarrollo sexual de las hembras bovinas tiene gran importancia para la producción. Esta revisión nos recuerda cuales son y cómo influyen las distintas variables que determinan el momento en que se produce la pubertad en los bovinos hembra. (ARAUJO, Álvaro, 2011)

La eficiencia reproductiva es un carácter de suma complejidad en el cual intervienen muchos aspectos fisiológicos, además de una adecuada conformación anatómica. En la vaca se observará:

- a. Producción del primer estro con ovulación a una cierta edad.
- b. Regularidad del estro con ovulación.
- c. Duración e intensidad del estro.
- d. Momento de ovulación en relación al inicio y terminación del estro.
- e. Desarrollo del ciclo uterino y su sincronización con las funciones ováricas para crear condiciones óptimas para fecundación y nidación.
- f. Constitución y efectividad funcional del óvulo.
- g. Desarrollo normal del cigote, embrión y feto.
- h. Parto normal. (Castro Ramírez, Álvaro, 2009)

### **2.1.3. Ovogénesis**

La ovogénesis comienza en la vida fetal con la división mitótica de las ovogonias. En determinado momento, estas células se transforman en ovocitos y comienzan el proceso de meiosis, el cual permite obtener una célula haploide capaz de ser fecundada (óvulo) en el útero de la vaca receptora. (Galina, H. et. al, 2010)

Luego de comenzada la meiosis, los ovocitos son rodeados por células foliculares, y se produce la detención de la misma en el estadio de diploteno, profase I, ovocito I, contenido en el folículo pre-ovuladorio reinicia su meiosis hasta el estadio de metafase II, ovocito II, estadio en el cual ovula y permanece así, hasta que se contacte con el espermatozoide, en el momento de la fecundación y se transforme en óvulo. Se debe tener en cuenta que al momento del nacimiento, todas las hembras mamíferas nacen con una gran reserva de ovocitos los cuales declinan rápidamente a medida que se llega a la pubertad de la nueva vaca. (Palma, Gustavo, 2011)

En los bovinos es desconocido, si el mecanismo representa una eliminación de ovocitos defectuosos que afectarían la eficiencia reproductiva de la hembra reproductora en los bovinos.

#### **2.1.4. Foliculogenesis**

Permite obtener un folículo pre-ovuladorio a partir de folículos primordiales. Este proceso comienza en la vida fetal, en el cual se constituye la reserva de folículos primordiales; y en la vaca reproductora se necesitan meses para que un folículo primordial se transforme en un folículo de Graff. (Palma, Gustavo, 2011)

Los folículos primordiales están formados por el ovocito rodeado de una capa de células foliculares planas (células pregranuladas) y por mecanismos intraováricos, no dependiente de gonadotrofinas, comienzan a crecer y entran en el pool de folículos en crecimientos. Los signos más precoces que indican que ha comenzado el crecimiento en este tipo de folículos son:

- 1) Un incremento en el tamaño del ovocito.
- 2) Un cambio en la forma de las células granulosas, pasan de planas a cúbicas.
- 3) Se comienza a formar la zona pelúcida, denominándose a esta estructura folículo primario. (Baker., 2009)

Posteriormente las células cúbicas se multiplican y aparecen 2 y más capas de la misma. En dicho momento una red de capilares invade la trama fibrosa ubicada entre las células

que rodean al folículo y constituyen la capa vascular teca interna, la cual aporta los nutrientes a la membrana granulosa y al ovocito. Por fuera de esta capa se encuentra la teca externa en tejido conectivo y fibroblastos, recibiendo la denominación de folículos secundarios. (Baker., 2009)

Posteriormente, comienzan a aparecer espacios entre las células granulosas, consecuencia de la secreción de un material de consistencia líquida por parte de dichas células. Dichos espacios confluyen en una cavidad denominada antro folicular, el cual irá aumentando en tamaño hasta adquirir las características de aquel folículo preovulatorio. A partir de la aparición de la cavidad folicular, los folículos reciben el nombre de folículos terciarios.

La comprensión de los mecanismos que regulan la Foliculogénesis durante el ciclo estral es esencial para lograr una mayor eficiencia en la aplicación de técnicas utilizadas en el control de la ovulación bovina. El conocimiento de los cambios y fenómenos fisiológicos relacionados con el crecimiento y degeneración de los folículos ováricos durante el ciclo estral de diversas especies domésticas ha avanzado durante las dos últimas décadas de investigación. (Espinoza, José Luís, 2009)

En definición, el folículo, es el compartimiento que permite el desarrollo ovocitario, de tal manera que cumple dos funciones fundamentales: la producción de ovocitos fecundables y la secreción de hormonas que mantienen la gestación y aseguran la implantación y desarrollo exitoso del embrión en el útero. (Espinoza, José Luís, 2009)

### **2.1.5. Extracción de ovocitos**

#### **Disección**

La disección consiste en aislar cada folículo ovárico del resto de tejido con ayuda de pinzas y tijeras adecuadas y asépticas, liberando posteriormente los ovocitos tras la ruptura controlada del folículo intacto de la madre bovina reproductora que se analiza.

- Diámetro y grado de atresia del folículo conocido.
- Elevado rendimiento: 90-100 ovocitos/ folículo diseccionado.

- Mayor proporción de ovocitos de buena calidad (60%).
- Máxima integridad de las células del cumulus oophorus.
- Limitación: tiempo experimentos con pocos ovocitos.
- Importancia del origen folicular de los ovocitos. (Espinoza, José Luís, 2009)

### **Corte slicing**

El corte slicing consiste en realizar cortes longitudinales y transversales con una hoja de bisturí completamente aséptica en la superficie de los ovarios para liberar los ovocitos.

Mayor % de ovocitos recuperados / ovario.

Menor proporción de ovocitos de buena calidad (30 - 45%):

- Menor integridad del cumulus.
- Ovocitos de mayor calidad firmemente anclados en el folículo.
- Mayor rapidez de recogida de ovocitos: s/ovarios disponibles selección más estricta.
- Bovino: Solución salina + heparina. (Espinoza, José Luís, 2009)

### **Aspiración folicular**

Bovino: el método más utilizado:

- Menor rendimiento: 30 - 60 ovocitos / 100 folículos aspirados.
- Menor proporción de ovocitos de buena calidad (45%).
- Menor integridad del cumulus (disgregación de las células a la aspiración).
- Ovocitos de mayor calidad firmemente anclados en el folículo.
- Mayor rapidez de recogida de ovocitos: s/ovarios disponibles selección más estricta. (Espinoza, José Luís, 2009)

## **2.1.6. La crioconservación**

La crioconservación es la técnica más utilizada en la granja en la actualidad. Aunque se pensaba que sería un gran avance en la reproducción bovina, no ha acabado de suponer un

éxito, ni mucho menos resulta tan importante como la inseminación artificial. La crioconservación debe estar asociada a otras especies: superovulación, recuperar embriones, crioconservación y dar los embriones. El éxito sería tener la capacidad de poder sexar los embriones. (Crioconservación, 2012)

La crioconservación es la técnica de conservación de material genético que se aplica manteniendo los embriones a menos de  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$  punto donde el material embrionario queda parado. Deberá ser reversible y que se mantenga la integridad celular. (Suaréz, L., et. al., 2011)

La finalidad es la de separar en el tiempo la obtención de los embriones y su transferencia  $\rightarrow$  mantenimiento indefinido. Se dice que su viabilidad sólo se afecta por las radiaciones ambientales y, por lo tanto, se piensa que puede aguantar sin problemas durante siglos. (Gispert Cruells, Jorge, 2005)

El cultivo in vitro o in vivo no para el material embrionario y, por lo tanto, no permite el mantenimiento indefinido de los ovocitos. La refrigeración entre  $0$  y  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  permiten mantener los embriones unas cuantas horas nada más. (Instituto Bernabeu, 2013)

El primer nacimiento se hizo en el año de 1972 en ratón. A partir de ahí, se han hecho en otras especies. En el cerdo se hace en el año de 1989 porque es una especie difícil, ya que es sensible a la baja temperatura. (Instituto Bernabeu, 2013)

Hoy en día, no es una técnica todavía efectiva del todo. Funciona muy bien en rumiantes  $\rightarrow$  viabilidad de embrión crioconservado que es muy parecido a la del embrión fresco (50 - 60%). Pero no es siempre como el cerdo. (Almela Cruz, Laura, 2014)

Como más joven es el embrión, más difícil es que supere la crioconservación y, por lo tanto, más frecuentemente blastocisto. La excepción se da en ratón y conejo, ya que todos los estadios son resistentes a crioconservación. (LOLAS, F., et. al., 2009)

En la granja se recupera unos 4 embriones de media (se puede, en condiciones muy buenas, recoger hasta 6 embriones). Ahora, en el 1999, también se recogen 4 embriones



por hembras donantes. Se aumenta el número de embriones transferidos, pero se aumenta mucho la criopreservación. (Instituto Bernabeu, 2013)

La criopreservación está limitada por el éxito de la superovulación y recuperación del embrión (si no se hacen no tenemos embriones para criopreservación). (Palma, Gustavo, 2009)

### **Etapas del proceso de criopreservación**

Hay seis etapas:

1. Embriones deben perder agua progresivamente. Además, también deben contactar con sustancias crioprotectoras. Protegen estabilizando la membrana (Dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol). Además, también bajan el punto de congelación del embrión.
2. Enfriar el embrión asegurándose que el medio extracelular congela de forma segura a inducción de cristalización extracelular añadiendo cristales de hielo a  $-5/-7^{\circ}\text{C}$ .
3. Enfriar el embrión de forma lenta y progresiva a  $-0'2^{\circ}\text{C} / \text{minuto}$  a  $-0'5^{\circ}\text{C} / \text{minuto}$  con aparatos caros hasta  $-40^{\circ}\text{C}$ . Puede durar hasta tres horas. Tienen una capacidad limitada. En bovino, sólo un embrión / pajita.
4. Se almacena a  $-196^{\circ}\text{C}$  en  $\text{N}_2$  líquido de forma indefinida. La temperatura de la fase líquida es económica para tener bajas temperaturas porque es una forma fácil de tenerla.
5. Se debe descongelar cuando se quiere utilizar o usar. La tasa de descongelación depende mucho de la temperatura a la que se paró el enfriamiento. Si se para a  $-80^{\circ}\text{C}$ , la descongelación debe ser lenta para que pueda recuperar su volumen de forma lenta y progresiva. Si se para a  $-40^{\circ}\text{C}$ , se sabe que hay muy pocos cristales pequeños intracelulares que no matan el embrión y se debe aplicar una descongelación rápida para que crezca por nucleación y evitar que puedan crecer los cristales dentro del embrión.
6. Se debe eliminar el crioprotector dentro del embrión. Hoy día se están descubriendo procedimientos que rompen con el enfriamiento lento y progresivo. El método convencional es de equilibrio. Los métodos de no equilibrio o vitrificación exponen los embriones a unas concentraciones de solutos tan altas que cuando se disminuye la temperatura, la viscosidad es tan grande que no cuenta, sino

que vitrifica hasta que queda sólido sin cristalizar a las moléculas que quedan paradas sin cristalizar. (Baker., 2009)

Los cristales tienen las moléculas organizadas y no son transparentes. Se consigue una solidificación sin formar cristales. Permiten una alta viabilidad, incluso para embriones muy sensibles a la manipulación. Permite pasar de temperatura ambiente a N2 líquido. Es un proceso muy rápido. La viabilidad más o menos es igual que la convencional. La solución puede llegar a ser tóxica. (Pinto, Gabriel, 2003)

### **2.1.7. La calidad de ovocitos**

Uno de los factores que afectan a la fertilidad femenina es la baja calidad ovocitaria. Normalmente, una óptima calidad ovocitaria da lugar a embriones con mayor capacidad de implantar en el útero materno de la vaca bovina. La calidad de los ovocitos está directamente relacionada con la edad. A medida que se van envejeciendo, la calidad empeora además de reducirse su número. Sin embargo algunas mujeres jóvenes pueden tener una baja reserva ovárica como consecuencia de problemas de salud o causas genéticas. (Reserva Ovárica, 2012)

La cantidad de ovocitos con los que cuenta una mujer es importante pero no tanta como la calidad de los mismos. La combinación resultante del número y de la calidad se conoce como reserva ovárica. Estudios científicos demuestran que el tabaco, tratamientos con radio/quimioterapia, así como la endometriosis, afectan negativamente a la calidad ovocitaria. (Ochando, Iván, 2012)

Históricamente la evaluación de la madurez de los ovocitos se basaba en la expansión y el aspecto del complejo cumulus-corona que rodea al ovocito.

Esta valoración, aunque se acerca bastante a la maduración del ovocito, no es del todo fiable debido a la disparidad que puede existir en el proceso de maduración del ovocito y del cúmulo, en pacientes sometidas a estimulación ovárica controlada. (Veeck, LL., 2009)

Con la introducción de la ICSI, esta situación cambio completamente, ya que, al tener que denudar el ovocito antes de su microinyección, se podía visualizar mejor la morfología del mismo. (Paduczak, S., et. al., 2010)

Los ovocitos recuperados de pacientes sometidas a estimulación ovárica muestran diferentes estados de maduración meiotica. Solo los MII son válidos para la ICSI, mientras que los MI pueden ser cultivados durante unas horas para ver si se produce la liberación del corpúsculo polar, en cuyo caso podrán ser micro-inyectados. Los ovocitos en profase I, que muestran vesícula germinal, no pueden ser utilizados debido a que tienen carga cromosómica diploide. (Palma, Gustavo, 2011)

Al mismo tiempo, el ovocito debe haber crecido completamente y haber completado la maduración nuclear y citoplasmática de una manera coordinada adecuadamente, para que pueda existir una correcta fecundación. Alteraciones o asincronias en este proceso pueden derivar en diferentes anomalías morfológicas, dependiendo de si se ha afectado la maduración nuclear, o la maduración citoplasmática.

Algunas alteraciones pueden ser causadas por un descenso del aporte sanguíneo al folículo durante la estimulación, lo que implica una deficiencia de oxígeno. Se ha demostrado la clasificación y cultivo de los ovocitos una asociación entre una disminución del aporte sanguíneo al folículo y defectos en el huso mitótico y en los cromosomas. La hipoxia también afecta a la concentración de ATP intracitoplasmático y la organización del citoplasma. (Delgado, A. Et al. , 2008)

Se acepta que los ovocitos metafase II de buena morfología deben de tener un citoplasma nítido y moderadamente granuloso, un espacio perivitelino pequeño, un corpúsculo polar intacto y una zona pelucida clara, aunque la mitad de los ovocitos que se recuperan son morfológicamente anormales, y presentan tanto anomalías citoplasmáticas como extracitoplasmáticas.

Algunos autores han encontrado una correlación entre la morfología ovocitaria y el resultado del tratamiento reproductivo, mostrando una tasa de embarazo del 24% en pacientes a las que se les habían transferido embriones procedentes de ovocitos normales,

frente al 3% obtenido cuando los embriones derivaban de ovocitos con anomalías citoplasmáticas. (Carpio Pertierra, Guillermo, 2013)

Resultados similares encontraron otros autores. Cuando los embriones se originaban a partir de ovocitos normales, la tasa de embarazo era del 29,4%, mientras que si los ovocitos presentaban citoplasmas oscuros, la tasa resultante era del 5,5%. Así mismo, cuando el citoplasma presentaba un aspecto muy granuloso, las tasas de embarazo se situaban alrededor del 12,8%. Se ha encontrado un descenso en la tasa de aborto temprano en pacientes a los cuales no se les habían transferido embriones procedentes de ovocitos dismorficos (20%, frente a 58,3% en dismorficos). Este efecto negativo puede ser explicado por la elevada tasa de aneuploidias encontradas en ovocitos dismorficos. (Cabello, 2009)

Los diferentes protocolos de estimulación han contribuido a la divergencia que existe en la literatura científica respecto a la correlación con los resultados ICSI.

Las anomalías extracitoplasmáticas incluyen irregularidades en la forma de los ovocitos, ampliación del espacio perivitelino, fragmentación del primer corpúsculo polar y la consistencia anormal del oolema y de la zona prelucida. Algunos de estos rasgos están asociados con un descenso en la supervivencia de los ovocitos tras la ICSI, pero no con la fecundación ni con la calidad embrionaria.

Sin embargo, un corpúsculo polar intacto con una superficie lisa conlleva un buen pronóstico en términos de fecundación y calidad embrionaria, así como en la tasa de implantación y de embarazo. Otros autores han demostrado también que una serie de factores como corpúsculo polar fragmentado, espacio perivitelino grande, inclusiones citoplasmáticas, etc., tienen un efecto negativo en relación a la calidad embrionaria y al porcentaje de cigotos. (Veeck, LL., 2008)

### **1.1.7.1. Características morfológicas del ovocito**

Las características morfológicas del ovocito bovino son las siguientes:

- Corpúsculo polar: La presencia de un corpúsculo polar dismórfico, aunque no afecte a la tasa de fecundación, sí afecta al posterior desarrollo del embrión, así como a la tasa de embarazo.
- Espacio perivitelino: Es agrandado, irregular, con contenido en su interior, disminuye la tasa de embarazo, aunque no afecte a la tasa de fecundación.
- Zona pelúcida: La existencia de una zona pelúcida engrosada, adelgazada, irregular o tabicada o con diferente densidad, afecta a la tasa de ovocitos que no continúan su desarrollo tras la ICSI.
- Citoplasma: La presencia de anomalías del citoplasma como granulaciones, inclusiones, cuerpos refractiles, vacuolas, se ha demostrado que disminuye la tasa de embarazo. Otros autores consideran que las anomalías en el citoplasma son un factor pronóstico pobre, aunque sí un signo de inmadurez citoplasmática.
- Se ha demostrado una relación directa entre las anomalías citoplasmáticas y el número aneuploidias. (Barros, C. M., 2012)

**TABLA No. 1. CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS**

<b>CLASIFICACIÓN</b>	<b>CRITERIOS</b>
<b>1</b>	Cúmulus con capas múltiples. Cúmulus compacto. La totalidad de los ovocitos es clara y transparente. Citoplasma homogéneo.
<b>2</b>	Cúmulus como 1 o más oscuro y menos transparente. Ooplasma con granulación más gruesa y más oscura que en 1 en la periferia.
<b>3</b>	Cúmulus menos compacto, más oscuro que en 1 o 2. Con manchas oscuras.
<b>Buena</b>	Cúmulus con capas múltiples, compacto pero traslucido. Ooplasma con granulación fina, densa y uniforme. Cúmulus ligeramente expandido, con menor número de capas que pueden cubrir la mitad de la zona pelúcida, granulaciones ligeramente más gruesas.
<b>Regular</b>	Cúmulus parcialmente expandido y disperso. Red de uniones con presencia de células del cúmulus. Ovocitos pequeños o grandes, ovocitos desnudos.
<b>Mala</b>	Cumulus muy oscuro (marrón oscuro, negro). Ooplasma de color muy claro o negro. Ooplasma bueno con áreas muy claras o muy oscuras.

### **1.1.7.2. Cultivo de los ovocitos**

Una vez que tenemos los ovocitos clasificados los colocaremos en un medio adecuado para desarrollar el estudio de cada uno de ellos. El medio o medios adecuados serian todos aquellos que serán capaces de responder a las necesidades metabólicas del embrión en cada momento evolutivo.

#### **Clasificación y cultivo de los ovocitos**

Es común aceptar que el piruvato y el lactato son la fuente de energía preferida en los primeros estadios de desarrollo realizados. El consumo de glucosa es bajo en esta primera fase y comienza a aumentar conforme aumenta el número de células y la síntesis de proteínas. (De Vos A., et. al., 2009)

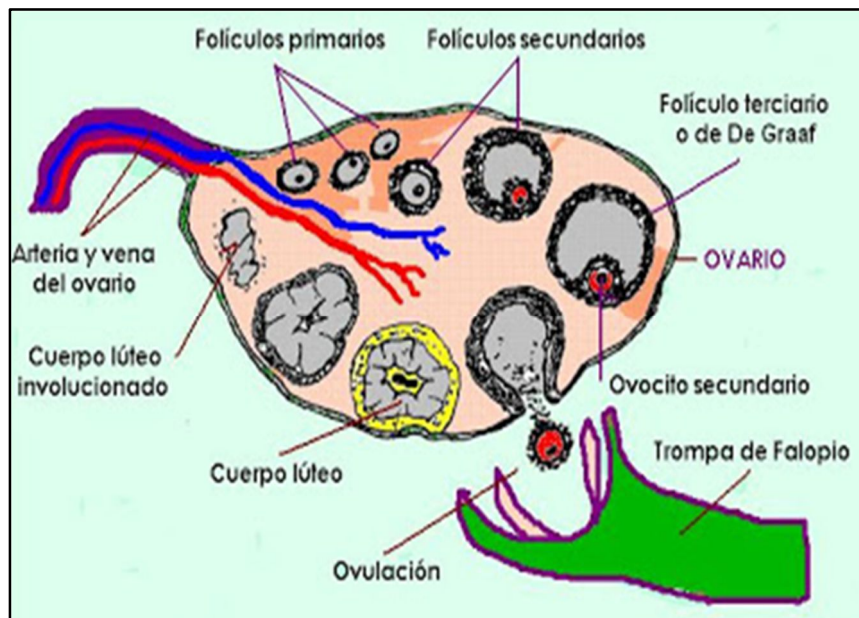
Según el volumen de medio de cultivo utilizado en caso de estudio, este puede ser de dos tipos: 1) microgotas de 20 a 30  $\mu$ l dispuestas en una placa de cultivo y cubiertas con aceite mineral, y; 2) pocillo con un volumen de medio entre 0,5 y 1 ml. (Eddy, E. Et al., 2009)

Durante el cultivo embrionario, el embrión produce una serie de factores de crecimiento, autocrinos y paracrinos que ayudaran al desarrollo de los embriones que se encuentren en el mismo cultivo. Este es uno de los motivos por el que algunos autores consideran que estos factores producen un efecto beneficioso sobre el desarrollo y la morfología del embrión y en consecuencia sobre su capacidad de implantación. (Scott, LA. et. al., 2008)

El cultivo embrionario puede realizarse individualmente o en grupo. Aunque es más frecuente que el cultivo en grupo se realice en pocillo y el individual en microgota, no es estrictamente necesario que ocurra siempre así. A los efectos beneficiosos del cultivo en grupo, debemos añadir los efectos perjudiciales derivados del acumulo de productos de desecho metabólico. En consecuencia, los cultivos embrionarios en grupo no deben contener más de 4 embriones. (Palma, Gustavo, 2011)

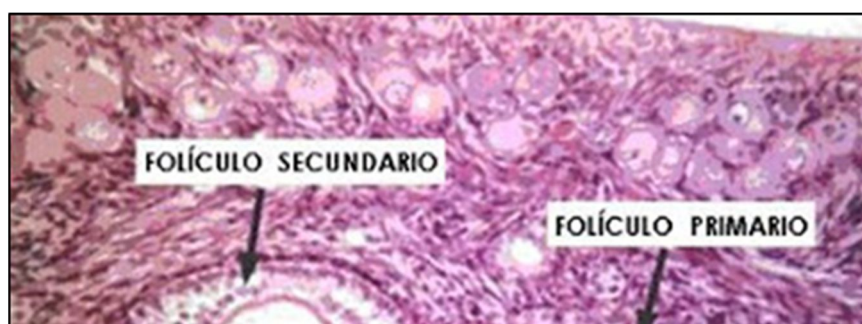
El cultivo en microgota (que no debe contener un volumen inferior a 20 microlitros, permite el seguimiento individualizado del desarrollo evolutivo de cada uno de los embriones. No existen diferencias significativas en los resultados obtenidos, refiriéndonos a calidad embrionaria, tasa de implantación y tasa de embarazo, realizando el cultivo embrionario en pocillo o en microgota. (Behr, B., et. al., 2004)

**GRÁFICO No. 2**  
**ESQUEMA DEL DESARROLLO DE LOS FOLÍCULOS OVÁRICOS**



Fuente: <http://hnnbiol.blogspot.com/2008/01/ovogenesis.html>

**GRÁFICO No. 3**  
**MICROFOTOGRAFÍAS DE UN CORTE DE OVARIO I**

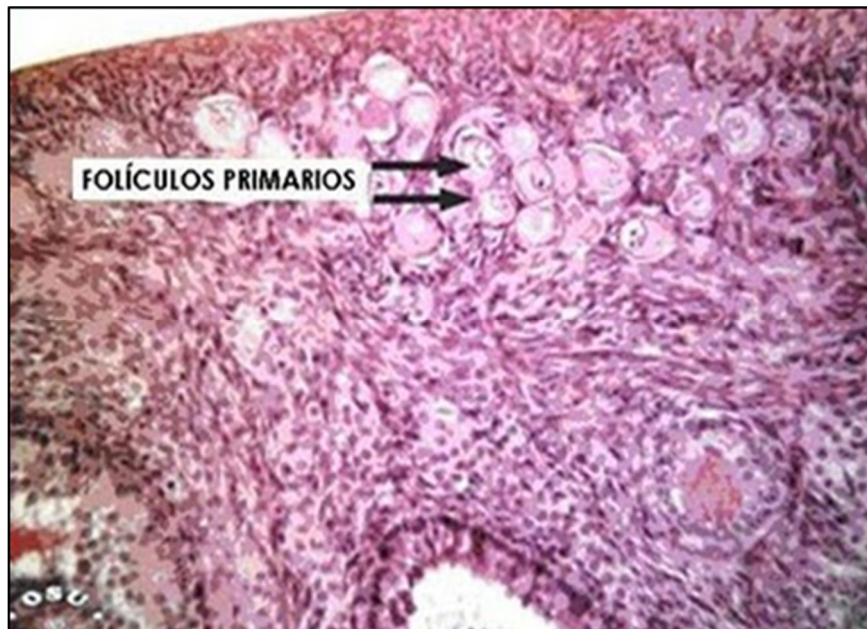




Fuente: <http://hnnbiol.blogspot.com/2008/01/ovogenesis.html>

**GRÁFICO No. 4**

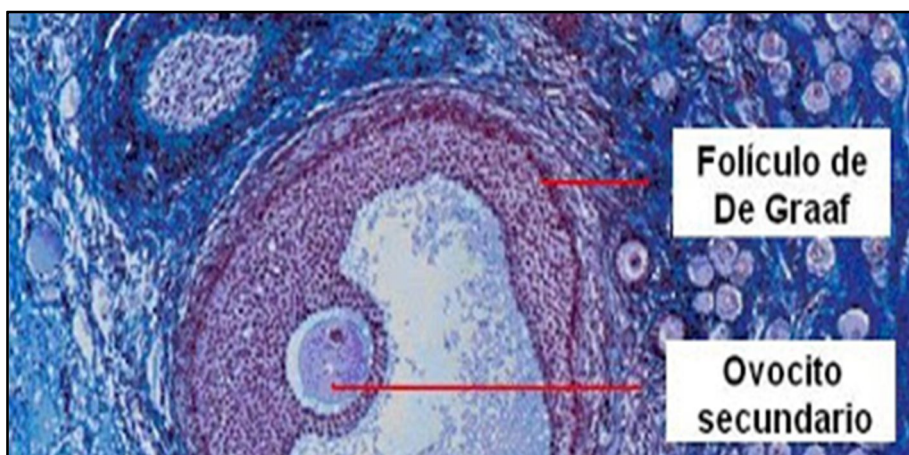
**MICROFOTOGRAFÍAS DE UN CORTE DE OVARIO II**



Fuente: <http://hnnbiol.blogspot.com/2008/01/ovogenesis.html>

**GRÁFICO No. 5**

**MICROFOTOGRAFÍAS DE UN CORTE DE OVARIO III**



Fuente: <http://hnnbiol.blogspot.com/2008/01/ovogenesis.html>

## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

En este capítulo se detalla la metodología y materiales utilizados para realizar la presente investigación, así mismo se describe las características y la ubicación del lugar donde se desarrolló la investigación.

#### 2.1 Características del lugar.

❖ **Situación política.**

**Provincia:** Cotopaxi.

**Cantón:** Latacunga.

**Parroquia:** Eloy Alfaro.

**Barrio:** Salache Bajo.

❖ **Situación geográfica.**

**Latitud:** 00°59'47,68" S.

**Longitud:** 78°31'19,16" E.

**Altitud:** 2757 m.s.n.m.

❖ **Datos meteorológicos.**

**Temperatura promedio:** 10,7°C.

**Pluviosidad:** 175 mm (anuales).

**Horas luz/día:** 12 horas.

**Viento:** Sureste – Noreste.

**Nubosidad anual:** 4,718.

**Fuente:** Registros Administración CEYPSA 2007

## **2.2 Materiales.**

### ***2.2.1 Materiales de oficina.***

- Papel bond.
- CDs.
- Libreta de apuntes.
- Copias.
- Anillados.
- Empastados.
- Impresiones.

### ***2.2.2 Recursos tecnológicos.***

- Cámara digital.
- Impresiones.
- Flash memory.

### ***2.2.3 Materiales de laboratorio.***

- Mandil.
- Guantes.
- Crio protectores Holding y Etilen Glicol.

- Nitrógeno líquido.
- Agua inyectable.
- Caja Petri estéril.
- Centrifuga.
- Pipeta para captar los embriones.
- Pajillas estériles.
- Canastillas.
- Cronómetro.
- Artefacto de congelamiento.
- Pinzas para el “seeding”.
- Estereoscopio.
- Sustancia de holding.
- Nitrógeno líquido.
- Jeringuillas.
- Tijera.

#### ***2.2.4 Materiales de campo.***

- Overol.
- Termo.
- Botas.
- Guantes.
- Gorra.

#### ***2.2.5 Material biológico.***

- Ovarios de hembras bovinas faenadas.

### **2.3 TIPO DE INVESTIGACIÓN.**

#### ***2.3.1 Investigación no experimental.***

El método utilizado fue no experimental, ya que no se manipularon las variables, únicamente analizamos la calidad de los ovocitos de las hembras reproductoras, según la edad de las bovinas.

### ***2.3.2 Investigación Descriptiva.***

Describe las características y los datos de la población o fenómeno en estudio, en este caso la crioconservación de los ovocitos extraídos de los ovarios de bovinas en diferentes edades.

## **2.4 Métodos.**

### ***2.4.1 Método deductivo.***

La deducción va de lo general a lo particular.

El método deductivo es aquel que parte de los datos generales aceptados como valederos, para deducir por medio de razonamiento lógico varias suposiciones, es decir, parte de verdades previamente establecidas como principios generales, para luego aplicarlos a casos individuales y comprobar a si su validez. Con este método se compara entre los resultados y las hipótesis planteadas en la presente investigación. (Bernal, César, 2010)

### ***2.4.2 Método científico.***

El método científico es un proceso destinado a explicar fenómenos, establecer relaciones entre los hechos y enunciar leyes que expliquen los fenómenos físicos del mundo y permitan obtener, con estos conocimientos, aplicaciones útiles al hombre. Este método se empleó para exponer el proceso utilizado para obtener los mejores resultados en esta investigación. (Bernal, César, 2010)

## **2.5 Unidad de estudio.**

La presente investigación se realizó con 15 bovinas por lo tanto 30 ovarios.

## **2.6 Variables evaluadas.**

### ***2.6.1 Calidad de ovocitos.***

La calidad de los ovocitos se evaluó según las siguientes categorías.

- **Categoría 1.** Calidad buena, los ovocitos se encuentran completamente rodeados por tres capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo.
- **Categoría 2.** Calidad regular, los ovocitos están rodeados parcialmente por células del cúmulus o con citoplasma irregular.
- **Categoría 3.** Calidad mala, los ovocitos se encuentran totalmente desnudos.

### ***2.6.2 Madurez de los ovocitos.***

La madurez de los ovocitos se evaluó según las siguientes categorías.

- **Categoría 1.** Ovocitos con citoplasma granuloso homogéneo y rodeado en su totalidad por una masa compacta de células de cumulo.
- **Categoría 2.** Ovocitos con citoplasma granuloso homogéneo y rodeado en forma parcial por células del cumulo.
- **Categoría 3.** Ovocitos con citoplasma granuloso homogéneo y desprovisto de células del cumulo.

## **2.7 Manejo del ensayo.**

### ***2.7.1 Recolección de ovarios de hembras bovinas faenadas.***

Un día antes se procedió a ingresar al camal “Tecnológico de Saquisilí” para evaluar la condición corporal de los animales para su estudio, señalándoles con un spray, el mismo que no interfirió con la señal de los dueños de los animales.

El marcaje fue de la siguiente manera 5 animales con Grupo 1 en la edad que va desde 2 a 3 años, con Grupo 2 a los animales de 6 a 7 años y Grupo 3 para los animales de 10 a 11 años.

Dentro del faenamiento lo realizaron por la técnica de aturdimiento en la articulación atlanto -axial, para seguir con el degolle y desangrado de las hembras bovinas.

Se procedió al evisceramiento, donde se extrajo los ovarios y se colocó en envases estériles de orina con suero fisiológico, con su respectivo rotulamiento y transporte al laboratorio de biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria.

### ***2.7.2 Selección del ovocito.***

Previo llegada al laboratorio se procede a la limpieza y desinfección del lugar, la misma que se realizó con un amonio cuaternario y seguido a la colocación de la vestimenta adecuada.

Se realizó el secado de los ovarios con una toalla absorbente, con la misma se fija el ovario y se procedió a la disección de las estructuras anexas al ovario como son ligamentos y bolsa ovárica.

Seguido se realizó la técnica de aspiración folicular, que consiste en introducir el bisel de una jeringa en los folículos del ovario y jalar el embolo para extraer el líquido folicular, para ponerlo en una caja Petri con una gota de medio Holding.

Se lo lleva al estereomicroscopio, donde con la ayuda de una micro-pipeta se procedió a pasar a los ovocitos en varias gotas de holding para limpiarlo, ya limpios se los calificó, ya que el procedimiento de lavado puede hacer que un ovocito de buena calidad termine como de mala calidad.

### ***2.7.3 Selección de ovocitos.***

La selección se realizó siguiendo los siguientes criterios para el parámetro calidad:

- **Categoría 1.** Calidad buena, los ovocitos se encuentran completamente rodeados por tres capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo.
- **Categoría 2.** Calidad regular, los ovocitos están rodeados parcialmente por células del cúmulus o con citoplasma irregular.
- **Categoría 3.** Calidad mala, los ovocitos se encuentran totalmente desnudos.

La selección se realizó siguiendo los siguientes criterios para el parámetro madurez:

Los ovocitos de calidad 1 se proceden a evaluar la madurez con los siguientes criterios:

- **Categoría 1.** Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y rodeado en su totalidad por una masa compacta de células del cumulo.
- **Categoría 2.** Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y rodeado en forma parcial por células del cumulo.
- **Categoría 3.** Ovocitos con citoplasma polarizado y rodeado en su totalidad por células del cumulo.

Los ovocitos calificados en calidad 1 e Inmaduros se proceden a colocarles en una gota del crio protector Etilen glicol, por unos cinco minutos.

#### ***2.7.4 Crioconservación de ovocitos***

Se coloca en una micropipeta la pajilla se absorbe etilen glicol limpio, se deja una burbuja para luego absorber a los ovocitos de calidad I e Inmaduros con medio Etilen glicol, otra burbuja de aire, y por ultimo otra gota de etilen glicol, y el tapón de la pajilla

Se prende la crioconservadora y se coloca el nitrógeno líquido en la misma, se pone las pajillas en el interior para que inicie el descenso de temperatura ambiente a – 7 grados centígrados en donde se realiza el seeding para esperar una temperatura de – 33 a -36 grados centígrados y se saca de la crio conservadora las pajillas e inmediatamente se coloca en el termo de nitrógeno líquido.

#### ***2.7.5 Descongelamiento de ovocitos.***



Se realizó sacando las pajillas del termo de nitrógeno líquido, se le colocó en un envase con agua a temperatura de 35 a 37 grados centígrados por un minuto para proceder a cortar la pajilla y con la ayuda de la micropipeta se deposita el contenido en una caja Petri para su evaluación.

## **CAPÍTULO III**

### **3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.**

En este capítulo se detalla a continuación los resultados obtenidos al culminar el procedimiento de crioconservación de ovocitos de bovinas de diferentes edades.

#### **3.1. Resultados obtenidos de los ovocitos de cada ovario.**

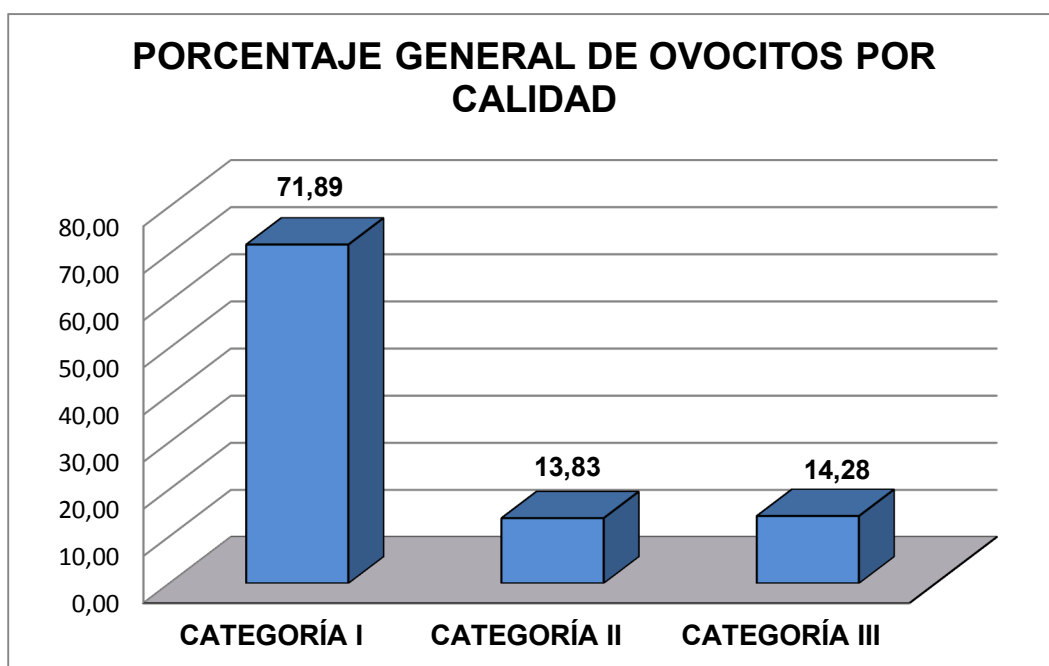
Se evaluó los ovocitos de cada ovario, determinando su calidad y madurez antes y después del proceso de crioconservación.

**TABLA No. 2. RESULTADOS GENERALES DE LA CALIDAD DE  
LOS OVOCITOS POR CATEGORIAS.**

OVARIOS	GRUPOS	CANTIDAD OVOCITOS POR OVARIO	CALIDAD DE LOS OVOCITOS RECOLECTADOS POR CATEGORÍAS		
			CATEGORÍA I	CATEGORÍA II	CATEGORÍA III
1	<b>G1 (2 -3 años)</b>	12	10	1	1
2		8	6	0	2
3		9	7	1	1
4		10	9	0	1
5		9	7	1	1
6		8	7	0	1
7		9	6	3	0
8		11	8	2	1
9		10	8	1	1
10		9	7	0	2
11	<b>G2 (6 - 7 años)</b>	6	4	1	1
12		5	4	0	1
13		7	5	1	1
14		7	5	1	1
15		7	5	1	1
16		6	4	1	1
17		9	5	3	1
18		7	5	2	0
19		8	5	2	1
20		8	5	0	3
21	<b>G3 (10 - 11 años)</b>	6	4	1	1
22		5	3	1	1
23		6	3	1	2
24		4	4	0	0
25		5	4	1	0
26		5	3	1	1
27		6	4	1	1

*FUENTE: Directa*  
*ELABORADO POR: Burgos Jefferson*

### **GRAFICO No. 6. PORCENTAJE GENERAL DE OVOCITOS POR CATEGORIAS DE CALIDAD**



*FUENTE: Directa*  
*ELABORADO POR: Burgos Jefferson*

Según la tabla número 2 y gráfico número 6, se obtuvieron 217 ovocitos equivalente al 100% de los tres grupos, de los cuales se clasifico según su calidad en categorías, obteniendo 156 ovocitos de categoría I, representando el 71,89%, 30 ovocitos de categoría II, representando el 13,83%, y 31 ovocitos de categoría III, representando el 14,28%.

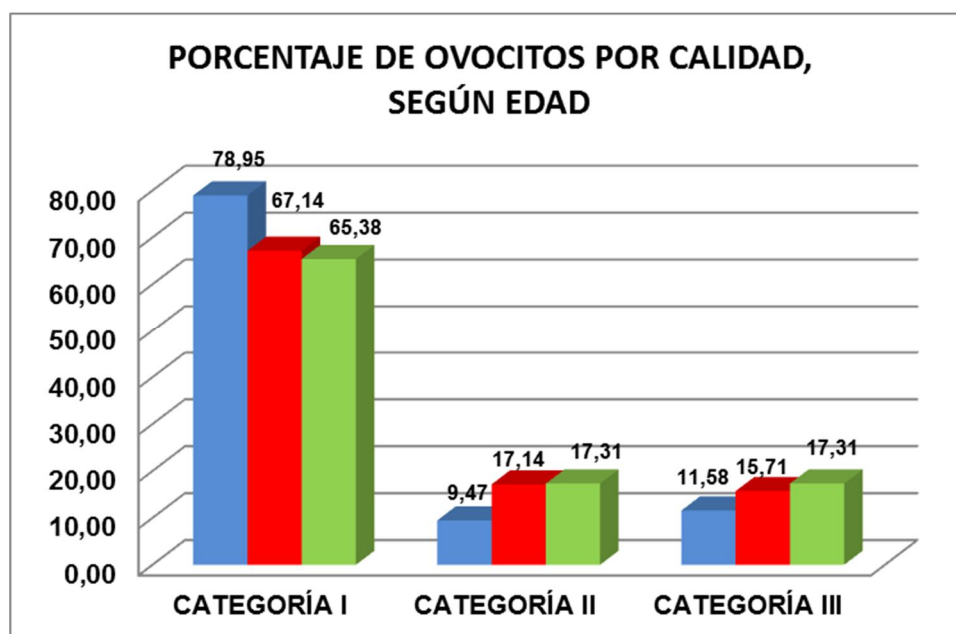
**TABLA No. 3. RESULTADOS DE LA CALIDAD DE OVOCITOS RECOLECTADOS POR CATEGORIAS SEGÚN LOS G1, G2, G3.**

Edad Años	Totales	CATEGORÍAS					
		I	%	II	%	III	%
De 2 - 3	95	75	78,95	9	9,47	11	11,58
De 6 - 7	70	47	67,14	12	17,14	11	15,71
De 10 - 11	52	34	65,38	9	17,31	9	17,31
<b>Total</b>	<b>217</b>	<b>156</b>	<b>71,89</b>	<b>30</b>	<b>13,82</b>	<b>31</b>	<b>14,29</b>
<b>Porcentaje</b>		<b>71,89</b>		<b>13,83</b>		<b>14,28</b>	

*FUENTE: Directa*

*ELABORADO POR: Burgos Jefferson.*

**GRÁFICO No. 7. PORCENTAJE DE OVOCITOS POR CATEGORIAS SEGÚN LA EDAD.**



*FUENTE: Directa*

*ELABORADO POR: Burgos Jefferson*

Como se observa en la tabla número 3 y gráfico número 7, el procedimiento de verificación de la calidad de ovocitos según la edad de las hembras bovinas se realizó con 10 ovarios en cada grupo y se obtuvo 95 ovocitos equivalente al 100% en el Grupo 1 de los cuales se clasificó según su calidad en categorías, obteniendo 75 ovocitos de categoría I, representando el 78,94%, 9 ovocitos de categoría II, representando el 9,48%, y 11 ovocitos de categoría III, representando el 11,58%. En el Grupo 2 se obtuvo 70 ovocitos que

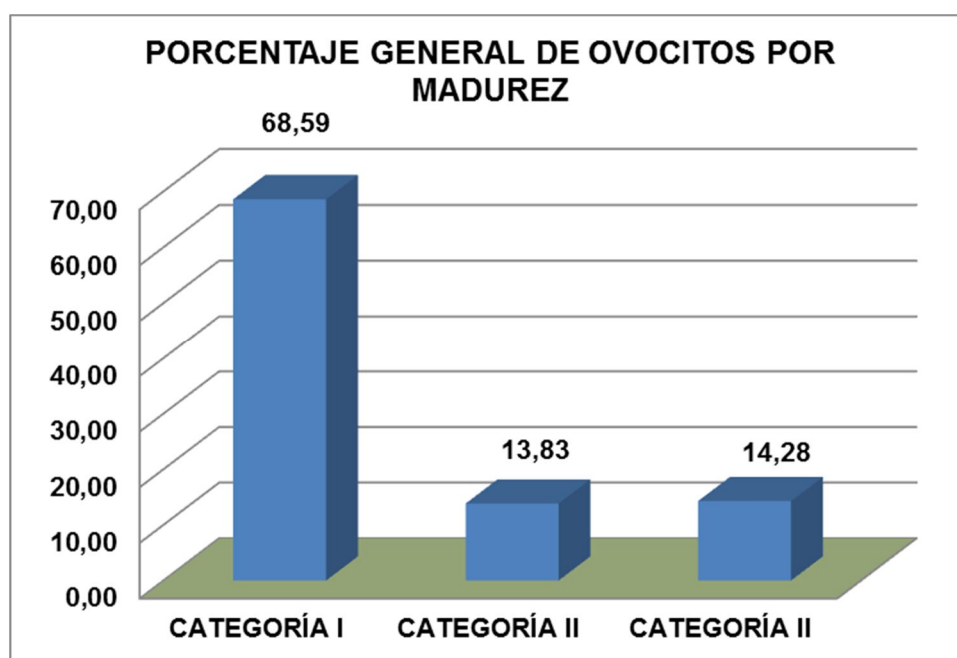
representa el 100% según su calidad en categorías, obteniendo 47 ovocitos de categoría I, representando el 67,14%, 12 ovocitos de categoría II, representando el 17,14%, y 11 ovocitos de categoría III, representando el 15,72%. En el Grupo 3 se obtuvo 52 ovocitos equivalentes al 100%, de los cuales en la categoría I 34 con el 64,99%, categoría II 9 con el 17,5 y la categoría III con un porcentaje similar al anterior por ser 9 el número de ovocitos en esta categoría.

**TABLA No. 4. RESULTADOS DE LA MADUREZ DE OVOCITOS RECOLECTADOS DE LA CATEGORIA I.**

Edad Años	Totales	CATEGORÍAS		
		CATEGORÍA I	CATEGORÍA II	CATEGORÍA III
De 2 - 3	75	57	7	11
De 6 - 7	47	29	8	10
De 10 - 11	34	21	6	7
<b>Total</b>	<b>156</b>	<b>107</b>	<b>21</b>	<b>28</b>
<b>Porcentaje</b>		<b>68,59</b>	<b>13,83</b>	<b>14,28</b>

*FUENTE: Directa*  
*ELABORADO POR: Burgos Jefferson*

**GRÁFICO No. 8. PORCENTAJE DE OVOCITOS POR CATEGORIAS DE MADUREZ**



*FUENTE: Directa*  
*ELABORADO POR: Burgos Jefferson*

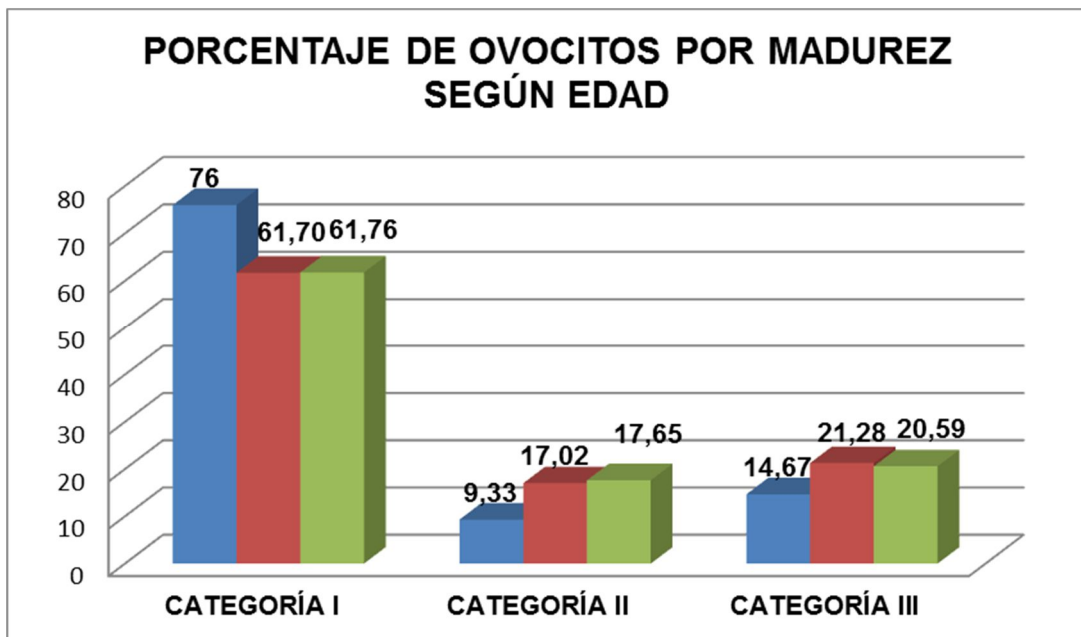
Como se observa en la tabla número 4 y gráfico número 8, se obtuvo 156 ovocitos dentro de la categoría I en el parámetro calidad equivalente al 100%, de los cuales se clasificó según su madurez en categorías, obteniendo 107 ovocitos de categoría 1, representando el 67,95%, 21 ovocitos de categoría 2, representando el 14,1%, y 28 ovocitos de categoría 3, representando el 17,95%.

**TABLA No. 5. RESULTADOS DE LA MADUREZ DE OVOCITOS RECOLECTADOS POR CATEGORIAS SEGÚN LOS G1, G2, G3.**

Edad	CATEGORÍAS						
Años	Total	I	%	II	%	III	%
De 2 - 3	75	57	76,00	7	9,33	11	14,67
De 6 - 7	47	29	61,70	8	17,02	10	21,28
De 10 -11	34	21	61,76	6	17,65	7	20,59
<b>Total</b>	<b>156</b>	<b>107</b>		<b>21</b>		<b>28</b>	
<b>Porcentaje</b>		<b>68,59</b>		<b>13,83</b>		<b>17,95</b>	

*FUENTE: Directa*  
*ELABORADO POR: Burgos Jefferson*

**GRÁFICO No. 9. PORCENTAJE DE OVOCITOS POR CATEGORIAS SEGÚN LA EDAD.**



*FUENTE: Directa*  
*ELABORADO POR: Burgos Jefferson*

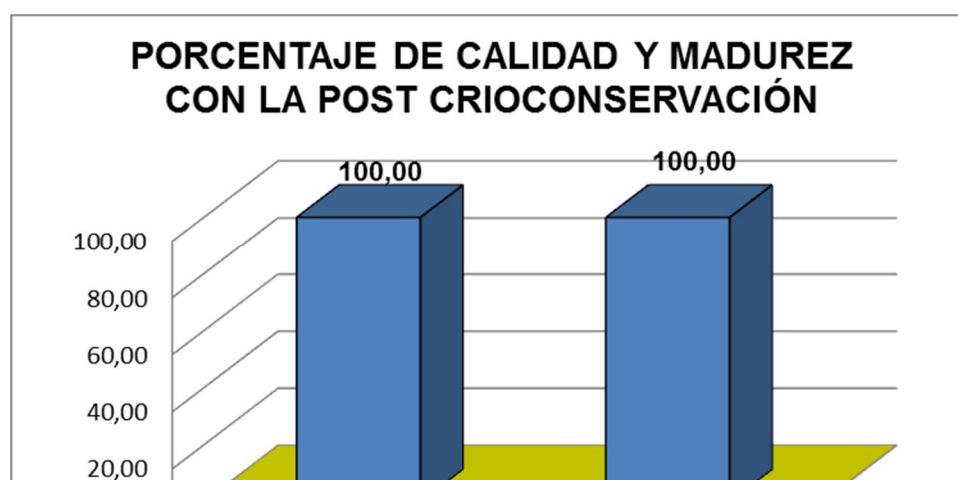
Como se observa en la tabla número 5 y gráfico número 9, el procedimiento de verificación de la madurez de ovocitos según la edad de las hembras bovinas se realizó con los ovocitos de categoría I en el parámetro calidad y se obtuvo 75 ovocitos equivalente al 100% en el Grupo 1 de los cuales se clasifico según su calidad en categorías, obteniendo 57 ovocitos de categoría I, representando el 76%, 7 ovocitos de categoría II, representando el 9,33%, y 11 ovocitos de categoría III, representando el 14,67%. En el Grupo 2 se obtuvo 47 ovocitos que representa el 100% según su calidad en categorías, obteniendo 29 ovocitos de categoría 1, representando el 61,7%, 8 ovocitos de categoría II, representando el 17,02%, y 10 ovocitos de categoría III, representando el 21,28%. En el Grupo 3 se obtuvo 34 ovocitos equivalentes al 100% de los cuales en la categoría I 21 con el 61,76%, categoría II 6 con el 17,65% y la categoría III con un porcentaje de 20,59% que representan 7 ovocitos en esta categoría.

**TABLA No. 6. RESULTADO DE LA CRIOCONSERVACION DE LOS OVOCITOS DE CATEGORÍA 1, SEGÚN SU CALIDAD Y MADUREZ.**

EDAD	OVOCITOS POR OVARIO DE CATEGORÍA I	CALIDAD	MADUREZ
De 2 - 3 años	57	57	57
De 6 - 7 años	29	29	29
De 10 - 11 años	21	21	21
<b>Total</b>	<b>107</b>	<b>107</b>	<b>107</b>
<b>Porcentaje</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

*FUENTE: Directa*  
*ELABORADO POR: Burgos Jefferson*

**GRÁFICO No. 10. RESULTADO DE LA VERIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS DE CATEGORÍA 1, SEGÚN SU CALIDAD Y MADUREZ.**



*FUENTE: Directa*

*ELABORADO POR: Burgos Jefferson*

Como se observa en la tabla 6 y gráfico 10, los 107 ovocitos de categoría I tanto en el parámetro de calidad y madurez, después de haber sido crío conservados y posteriormente descongelados no presentaron ninguna alteración, todos conservaron la misma calidad y madurez perteneciendo a la categoría 1, es decir representa el 100%.



## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación realizada en el laboratorio de biotecnología de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi, permite llegar a las siguientes conclusiones.

- El procedimiento se realizó con 30 ovarios correspondientes a 15 bovinas hembras y se obtuvo 217 ovocitos equivalente al 100% de los cuales se clasificó según la edad de las hembras bovinas, en el Grupo 1 95 ovocitos en donde 75 son categoría I en el parámetro calidad; en el Grupo 2 70 ovocitos con 47 de calidad I y en el Grupo 3 con 52 ovocitos, pero de estos 34 calidad I, por tanto en el parámetro calidad se obtiene 156 ovocitos. Lo que evidencia que a la juventud los ovarios presentan más actividad folicular y por ende más ovocitos que en animales maduros.
- El parámetro madurez se evaluó de los 156 ovocitos de Calidad I, en donde en el Grupo 1 con 57 ovocitos de categoría I, en Grupo 2 con 29 y Grupo 3 con 21, total ovocitos de calidad y madurez I 107.
- La crioconservación no afectó a los 107 ovocitos, demostrando que la curva 3 de preservaciones de células femeninas es la más adecuada.

## RECOMENDACIONES

Se debe incentivar a los estudiantes a seguir realizando este tipo de investigaciones en el Laboratorio de Biotecnología de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi, pues los avances en reproducción nos permiten seguir impulsando el mejoramiento genético, calidad de producción y perpetuar la especie de las distintas especies dedicadas a la explotación pecuaria.

- De acuerdo a la práctica realizada en el Laboratorio CEYPSA, se determinó y se recomienda que las bovinas reproductoras de 2 a 3 años de edad, son los ejemplares más óptimos para recolectar ovocitos para obtener nuevas crías con características genéticas similares y de calidad teniendo en cuenta que luego de ser adecuadamente crioconservados no sufren alteración alguna.
- Con la finalidad de cooperar con la reproducción y conservación genética de las características bovinas importantes (producción de leche y carne), debemos utilizar ovocitos maduros en calidad I, a fin de garantizar la conservación de sus estructuras internas de las ejemplares donantes y que estas se puedan utilizar para mejorar la rendimientos productivos y reproductivos de los hatos ganaderos locales.
- Al utilizar la crioconservadora se recomienda aplicar la curva 3, ya que esta nos permite controlar una baja de temperatura de forma adecuada y/a su vez mantener las características internas normales de los ovocitos utilizados para los procesos reproducción bovina.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Almela Cruz, Laura. (2014). Aportaciones a la crioconservación de gametos masculinos en la raza bovina Murciano Levantina: Recongelación de Espermatozoides. Murcia, España: IMIDA.
2. ARAUJO, Álvaro. (2011). *Programa de Zootecnia*. Colombia: CEAD.
3. Arteche. A., Et al. (2013). *Inseminación artificial a tiempo fijo de vacas tratadas con CIDR, benzoato de estradiol, asociado a eCG y destete temporal*. Argentina: Ecoe.
4. Baker. (2009). *El ciclo astral bovino*.
5. Barros, C. M. (2012). *Efeito do desmane temporário na sincronizacao da ovulacao para inseminacao artificial em tempo fixo*. *Acta Scientiae Veterinariae*. Brasil: Abstr.
6. Behr, B., et. al. (2004). *Effects of cultura conditions on MFoutcome*. USA: Eur .
7. Bernal, César. (2010). *Metodología de la Investigación*. Colombia: Pearson Educación.
8. Bo, G. (2009). *Actualizaciones del ciclo estral bovino. IV Jornadas Nacionales CABIA y I del MERCOSUR*. Venezuela: Valera.
9. Bo, G. (2012). *Memorias 9 Congreso de Producción e Industria Animal*. Venezuela: Valera.
10. Cabello, M. E. (2009). *Procedimientos Aduaneros I, Conceptos básicos*. España - Madrid: Taric .

11. Carpio Pertierra, Guillermo. (2013). *Influencia de la relación leptina / índice de masa corporal en estimulación ovarica controlada en reproducción asistida*. México: Universit.
12. Castro Ramírez, Álvaro. (2009). *Producción Bovina*. Costa Rica: Eumet.
13. De Vos A., et. al. (2009). *In - vitro matured metaphase - I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase - II oocytes after intracytoplasmatic sperm injection*. USA : Hum Reprod.
14. Delgado, A. Et al. . (2008). *Iniciativas recientes de la e-justicia en España*. España - Madrid: UOC.
15. Eddy, E. Et al. (2009). *Origin and migration of primordial germ celis in mammals gamete*. USA - New York: Print Art.
16. Espinoza, José Luís. (2009). *Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos*. Colombia: Munera.
17. Galina, H. et. al. (2010). *Reproducción e Inseminación en animales*. Egipto: Hafez.
18. Gispert Cruells, Jorge. (2005). *Conceptos de bioética y responsabilidad médica*. México: El manual moderno.
19. LOLAS, F., et. al. (2009). *Investigación en salud - Dimensión ética*. Chile: Andros.
20. Matorras, R., et. al. (2010). *Estudio y tratamiento de la pareja esteril*. España: Adalia.
21. Ochando, Iván. (2012). *Calidad Ovocitoria*. España: Eumet.
22. Paduczak, S., et. al. (2010). *Fecundación Asistida*. México: Carden.
23. Palma, Gustavo. (2009). *Biotecnología de la Reproducción*. Niger: Nippon.
24. Palma, Gustavo. (2011). *Biotecnología de la reproducción*. Argentina: Ecoe.
25. Pinto, Gabriel. (2003). *Didáctica de la Química y Vida Cotidiana*. España: E. T. S. de Ingenieros Industriales.
26. Ricardo, A. et al. . (2010). *Sincronización de los celos en hembras receptoras*.
27. Scott, LA. et. al. (2008). *The succesful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval*. USA: Hum Reprod.
28. Suárez, L., et. al. (2011). *Obtención, conservación y transferencia de embriones*. Argentina: DIANEC.
29. Veeck, LL. (2008). *Atlas of Human Gametes and Conceptuses*. USA: Parthernon Publising.
30. Veeck, LL. (2009). *Oocyte assessment and biological performance*. USA: Acad Sci.

## BIBLIOGRAFÍA VIRTUAL

31. *Crioconservación*. (06 de 04 de 2012). Recuperado el 06 de 12 de 2014, de [www.canal-h.net/webs/sgonzalez002/Manipulacion/CONSERVACION](http://www.canal-h.net/webs/sgonzalez002/Manipulacion/CONSERVACION)
32. Instituto Bernabeu. (17 de Enero de 2013). *Diccionario Ginecológico*. Recuperado el 18 de Enero de 2014, de <http://www.institutobernabeu.com/es/11-1-1/diccionario/729/zona-pelucida/>
33. Reserva Ovárica. (2012). *Instituto Ingenes*. Recuperado el 21 de Febrero de 2015, de <http://www.ingen.es.com/primeros-pasos/entendiendo-la-infertilidad/causas/factor-ovulatorio/reserva-ovarica/>

## ANEXOS.

### Anexo 1. Fotos de la Práctica en el Laboratorio del CEYPSA.

#### FOTOS

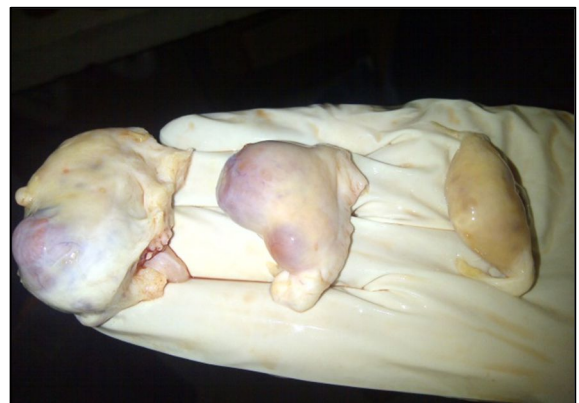
##### Selección de bovinas en camal



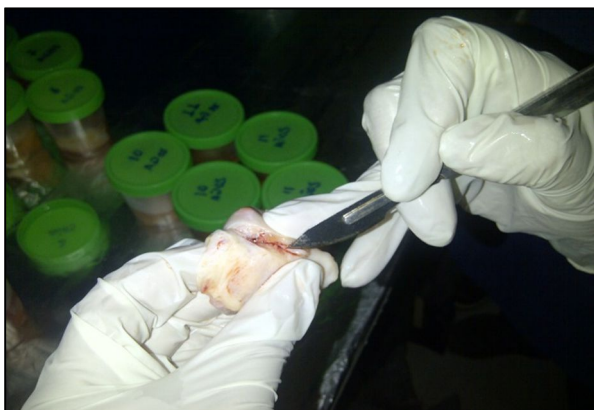
##### Grupos de ovarios por edad



### Ovarios por Grupos de Edad



### Dissección de ovarios y técnica de aspiración folicular



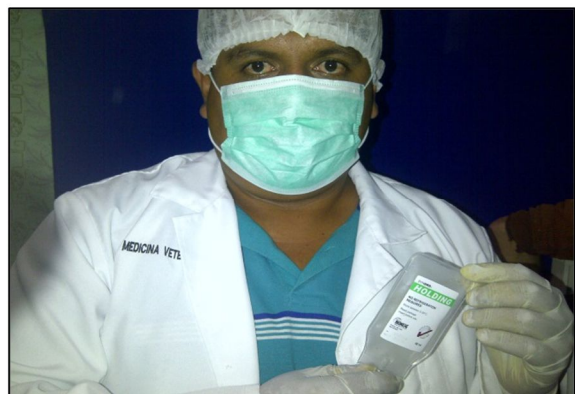
### Medio holding



### Etilen glicol



### Medio Holding

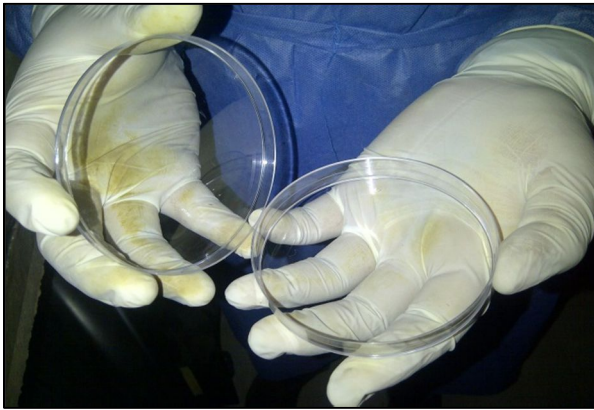




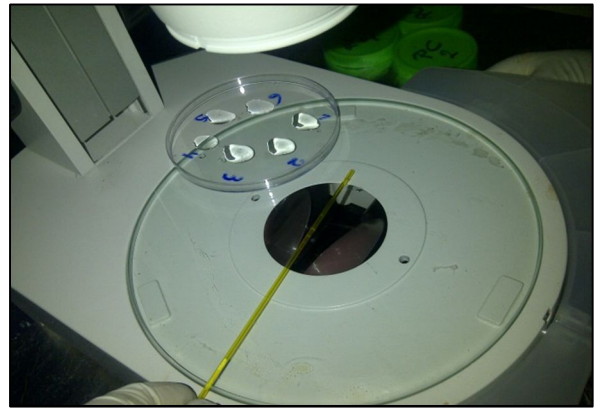
### Absorción de folículo



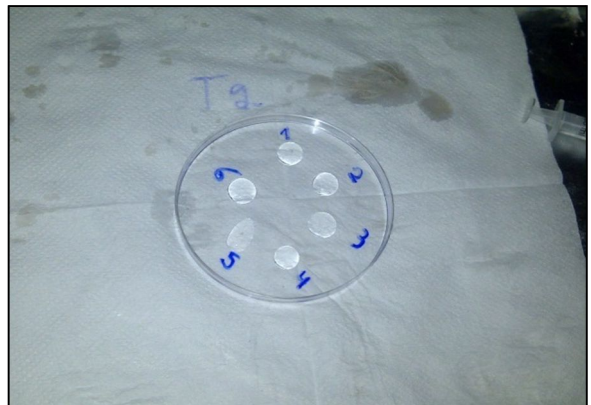
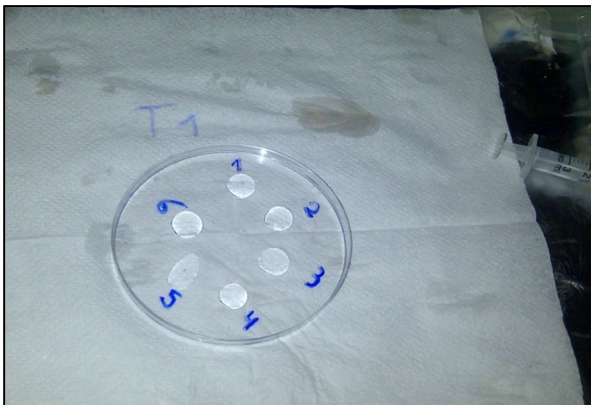
### Caja Petri estéril



### Recolección de ovocitos



### Limpeza de ovocitos (G1, G2, G3)





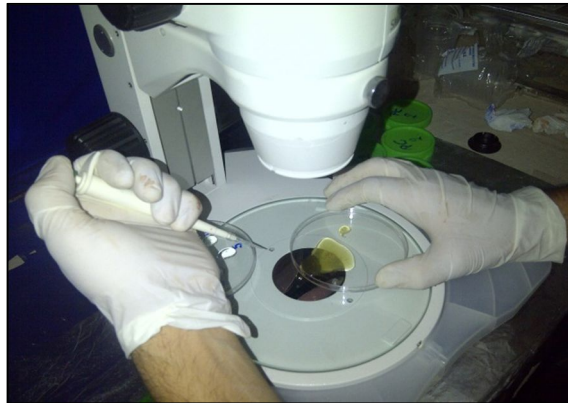
### Observación de ovocitos en estéreo microscopio



### **Absorción de ovocitos**



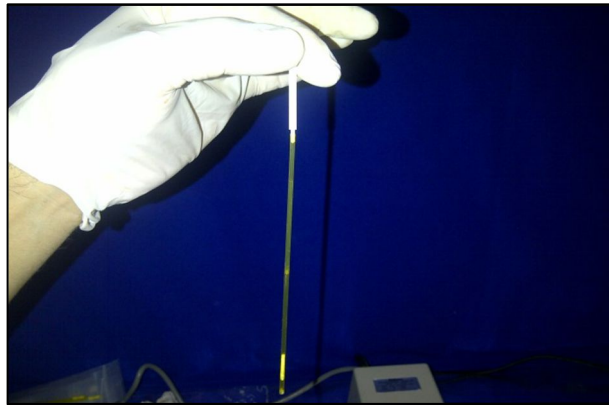
### **Colocación de folículos en medio Holding**



### **Absorción de ovocitos con Etilen glicol**



### Pajilla lista para crioconservar



### Crioconservadora



### Pajilla colocada en crioconservadora

