

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES.



## CARRERA: MEDICINA VETERINARIA

TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO  
ZOOTECNISTA

### TEMA:

**EVALUACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA OBTENCIÓN DE OVOCITOS (ASPIRACIÓN FOLICULAR, SLICING, EXPOSICIÓN FOLICULAR) CON DOS CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y POLIETILENGLICOL) EN CONEJAS (ORYCTOLAGUS CUNICULUS) DE MATADERO EN EL CEASA.**

### AUTOR:

Juan Oswaldo Paredes Alarcón

### DIRECTOR:

M.V.Z. Paola Jael Lascano Armas

LATACUNGA – ECUADOR

2015

# **AUTORÍA**

Yo, Juan Oswaldo Paredes Alarcón, declaro que el trabajo aquí descrito, la responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis es de mi autoría y que no ha sido 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 con la ley de propiedad intelectual, por su reglamentó y por la normativa institucional vigente.

.....  
Juan Oswaldo Paredes Alarcón

C.I. 0502567068

**AUTOR**

# **AVAL DE APROBACIÓN**

## **DIRECTOR DE TESIS**

En calidad de Director de Tesis Titulada “EVALUACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA OBTENCIÓN DE OVOCITOS (ASPIRACIÓN FOLICULAR, SLICING, EXPOSICIÓN FOLICULAR) CON DOS CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y POLIETILENGLICOL) EN CONEJAS (ORYCTOLAGUS CUNICULUS) DE MATADERO EN EL CEASA”. Propuesto por el egresado Paredes Alarcón Juan Oswaldo, como requisito previo a la obtención del Título de Médico Veterinario Zootecnista, de acuerdo con el Reglamento de Títulos y Grados, consideró 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.

Atentamente,

.....

M.V.Z. Paola Jael Lascano Armas  
Directora de Tesis

## **CARTA DE APROBACIÓN TRIBUNAL DE TESIS**

En calidad de miembros del tribunal de grado aprueban el presente informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi y CAREN por cuanto, el postulante **Paredes Alarcón Juan Oswaldo** con el tema de tesis “EVALUACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA OBTENCIÓN DE OVOCITOS (ASPIRACIÓN FOLICULAR, SLICING, EXPOSICIÓN FOLICULAR) CON DOS CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y POLIETILENGLICOL) EN CONEJAS (ORYCTOLAGUS CUNICULUS) DE MATADERO EN EL CEASA”, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de defensa de tesis.

Por lo antes expuesto se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

---

Dr. Mg. Rafael Alfonso Garzón Jarrin  
**Presidente del Tribunal**

---

Dr. Mg. Luis Alonso Chicaiza Sánchez  
**Miembro del Tribunal**

---

Mvz. Blanca Jeaneth Villavicencio Villavicencio  
**Opositor del Tribunal**

## **AGRADECIMIENTO**

Gracias a mi esposa Jacqueline por ser al mismo tiempo, mi más acérrimo crítico y mi más ferviente admiradora, además de ser mi soporte y baluarte durante todo este proceso académico.

A mi Madre, Doña Claudina, que gracias a su inmenso amor supo apoyarme en cada cambio de decisión y su valentía al formar ella sola a sus hijos.

A mis hermanas María José, María Fernanda y su esposo Vinicio por acompañarme y ayudarme en este proceso, en particular a mi hermana María Gabriela por ser modelo y apoyo incondicional en todo sentido.

Gracias a Don Segundo y Doña Estela por todas sus atenciones desde el momento que nos conocimos, y a Jorge Luis por su eterna confianza en mí persona.

A mi Directora de Tesis, la Mvz. Paola Lascano, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia, en un marco de confianza y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.

Un lugar especial a todos los que de una manera u otra me ofrecieron su apoyo moral para concluir este trabajo.

# DEDICATORIA

Dedico este trabajo a lo mejor de mi vida

Mi esencia

*Jacqueline y Juan Esteban*

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad del contenido de este proyecto de tesis, me corresponde exclusivamente y el patrimonio intelectual del mismo a la “UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”.

---

Juan Oswaldo Paredes Alarcón

## PRELIMINARES

PORTADA.....	i
AUTORÍA.....	ii
AVAL DE APROBACIÓN .....	iii
DIRECTOR DE TESIS .....	iii
CARTA DE APROBACIÓN.....	iv
TRIBUNAL DE TESIS .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
DEDICATORIA .....	vi
DECLARACIÓN EXPRESA .....	vii
PRELIMINARES.....	viii
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN .....	xviii



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	1
1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
1.1. El Conejo.....	1
1.2. Anatomía del aparato reproductivo de la hembra .....	1
1.2.1. Ovarios.....	2
1.2.1.1. Comparación morfológica del ovario en diferentes especies.....	3
1.2.2. Infundíbulo.....	4
1.2.3. Oviductos .....	5
1.2.4. Cuernos uterinos .....	5
1.2.5. Cuello uterino.....	6
1.2.6. Vagina.....	6
1.2.7. Vulva.....	6
1.3. Fisiología de La reproducción En El Conejo .....	6
1.3.1. El ciclo sexual de la coneja.....	9
1.3.1.1. Teoría de la no existencia de un ciclo sexual.....	10
1.3.1.2. Teoría del ciclo estral .....	11
1.3.2. El Celo .....	12
1.3.2.1. Cambio de conducta.....	12
1.3.2.2. Actitud con el macho .....	12
1.3.2.3. Color de la vulva .....	12
1.3.3. La ovulación.....	13
1.4. Aspectos fisiológicos de la reproducción .....	14
1.5. Fisiología ovárica de la hembra.....	16
1.5.1. Ovogénesis.....	16

1.5.2. Crecimiento folicular .....	18
1.5.2.1. Folículo primordial. ....	19
1.5.2.2. Folículo primario.....	19
1.5.2.3. Folículo secundario o preantral. ....	20
1.5.2.4. Folículo terciario o antral. ....	20
1.5.2.5. Folículo preovulatorio o de Graaf. ....	21
1.5.3. Maduración del óvulo .....	21
1.6. Ovocito .....	22
1.6.1. Estructura del ovocito .....	23
1.6.1.1. Zona pelúcida .....	23
1.6.1.2. Membrana plasmática .....	24
1.6.1.3. Pronúcleo ovular .....	24
1.6.1.4. Gránulos corticales.....	24
1.6.1.5. Espacio perivitelino.....	25
1.6.1.6. Clasificación de los ovocitos.....	25
1.7. Estado madurativo de los ovocitos .....	26
1.8. Métodos para la obtención de ovocitos. ....	27
1.8.1. Aspiración de líquido folicular .....	27
1.8.2. Corte de ovarios (Slicing) .....	27
1.8.3. Método de exposición folicular. ....	28
1.9. Crioprotectores .....	28
1.9.1. Crioprotectores permeables. ....	29
1.9.1.1. Etilenglicol. ....	30
1.9.2. Crioprotectores no permeables. ....	30
1.9.2.1. Polietilenglicol .....	31

CAPÍTULO II .....	32
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
2.1. Ubicación de la Investigación. ....	32
2.1.1. Ubicación Política. ....	32
2.1.2. Ubicación Geográfica .....	33
2.1.3. Datos meteorológicos.....	33
2.2. Recursos materiales. ....	33
2.2.1. Materiales de oficina.....	33
2.2.2. Recursos tecnológicos.....	34
2.2.3. Materiales de laboratorio .....	34
2.2.4. Material biológico .....	35
2.2.5. Animales .....	35
2.3. Tipo de investigación. ....	35
2.3.1. Experimental .....	35
2.4. Metodología.....	35
2.4.1. Métodos.....	36
2.4.2. Técnicas .....	37
2.5. Diseño experimental.....	37
2.5.1. Tratamientos .....	38
2.5.2. Unidades experimentales .....	38
2.6. Manejo del ensayo.....	39
 CAPÍTULO III .....	 43
3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	43
3.1. Técnicas de obtención de ovocitos .....	43
3.2. Técnicas y Crioprotectores pre congelación.....	44

3.3. Técnicas y Crioprotectores post congelación.....	46
CONCLUSIONES .....	49
RECOMENDACIONES .....	51
BIBLIOGRAFÍA. ....	52
ANEXOS .....	56

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1. Morfología del ovario según la especie .....	4
CUADRO N° 2. Órganos reproductores de la hembra y sus principales funciones	7
CUADRO N° 3. Porcentaje de saltos fecundos según el color vulvar. ....	13
CUADRO N° 4. Crioprotectores más utilizados en reproducción asistida para óvulos y embriones de distintas especies .....	29
CUADRO N° 5. Esquema del análisis de varianza (ADEVA).....	38
CUADRO N° 6. Número ovocitos recolectados y categorizados por técnica y calidad .....	43
CUADRO N° 7. Cantidad y calidad de ovocitos pre congelación, según técnica y crioprotector. ....	44
CUADRO N° 8. Análisis de la varianza técnicas y crioprotectores pre congelación .....	45
CUADRO N° 9. Cantidad y calidad de ovocitos post congelación, según técnica y crioprotector. ....	46
CUADRO N° 10. Análisis de la varianza técnicas y crioprotectores post congelación .....	46
CUADRO N° 11. Test Duncan para técnicas y crioprotectores. ....	46

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1. Número ovocitos recolectados y categorizados por técnica y calidad. ....	44
GRÁFICO N° 2. Cantidad y calidad de ovocitos pre congelación, según técnica y crioprotector .....	45
GRÁFICO N° 3. Cantidad y calidad de ovocitos post congelación, según técnica y crioprotector. ....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1. Aparato reproductivo de la coneja.....	2
FIGURA N° 2. Estructura del ovario.....	4
FIGURA N° 3. Ovulación en la coneja.....	14
FIGURA N° 4. Diagrama de la oogénesis.....	16
FIGURA N° 5. Estructuras del ovocito.....	22
FIGURA N° 6. Tipos de ovocitos por su calidad.....	25
FIGURA N° 7. Tratamientos.....	38

## RESUMEN

Con el objetivo de comparar tres métodos de recolección (aspiración folicular, slicing y exposición folicular) de ovocitos con dos crioprotectores (etilenglicol y polietilenglicol) se obtuvieron dichos ovocitos a partir de ovarios de hembras *Oryctolagus cuniculus* sacrificadas. El traslado se efectuó en un termo con cloruro de sodio al 0,9% en un periodo de 2 horas. Se emplearon tres técnicas para extraer los ovocitos, en la aspiración folicular, se introdujo el bisel de la jeringa dentro de cada uno de los folículos prosiguiendo a su aspiración para luego depositar el líquido folicular en una caja Petri junto con medio Holding para identificar ovocitos.

En la técnica de slicing realizó un corte transversal en el ovario con la ayuda de un bisturí número 15. Se hicieron lavados retrógrados del ovario seccionado con solución holding y el contenido con el líquido folicular se depositó en una caja Petri para su subsiguiente evaluación. En la técnica de exposición folicular, se cortó con ayuda de un bisturí el ovario extrayendo el folículo completo, se colocó en una caja Petri para su evaluación en el estereomicroscopio y con ayuda del bisel de la jeringa de insulina se procedió a extraer el ovocito.

Para la clasificación de los ovocitos se utilizó el criterio de la integridad de las capas de células del cúmulo y las características del citoplasma del ovocito. Se obtiene 36 ovocitos por el método de aspiración folicular, 63 ovocitos por slicing y 113 ovocitos por exposición folicular, Por el método de exposición folicular se obtienen 73 ovocitos calidad A, lo cual significa 34.24% del total utilizando el método de exposición folicular se recolecta mayor cantidad de ovocitos en cantidad y calidad que con los otros métodos, mientras que post congelación el etilenglicol dio mejores resultados manteniendo en su totalidad la calidad y por lo tanto la viabilidad de los ovocitos crioconservados.



## ABSTRACT

In order to compare three methods of collection (follicular aspiration, slicing and follicular exposure) oocytes with two cryo-protectants (ethylene glycol and polyethylene glycol) these oocytes were obtained from ovaries of females *Oryctolagus cuniculus* sacrificed. The transfer took place in a thermos with sodium chloride 0.9% over a period of 2 hours. Three techniques were used to extract the oocytes, in oocyte; the bevel of the syringe was introduced into each follicle aspiration for continuing to the deposit of the follicular fluid in a Petri dish through the Holding medium to identify oocytes.

In the slicing technique a cross-section was done in the ovary with a scalpel number 15 washes retrograde ovarian sectioned with holding solution and content with follicular fluid was deposited in a Petri dish for subsequent evaluation were made. In the technique of follicular exposure, the ovary was cut with a scalpel for extracting the full follicle, which was placed in a Petri dish for evaluation in the stereo microscope and using the bezel insulin syringe proceeded to remove the oocyte.

The criterion of the integrity of the layers of cumulus cells and the oocyte cytoplasm features was used for the correct classification of oocytes; 36 oocytes by the method of oocyte, 63 oocytes through the use of slicing and 113 oocytes by using follicular exposure is obtained by the method of follicular exposure 73 oocytes quality A, are obtained, which means 34.24% of using the method of follicular exposure collected as many oocytes in quantity and quality than other methods, while ethylene post freezing gave better results entirely keeping quality and hence the viability of cryopreserved oocytes.

# INTRODUCCIÓN

La biotecnología de la reproducción ha experimentado un gran avance en las últimas décadas y ha dotado a la ciencia de nuevas herramientas capaces de manipular y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados: los mamíferos, el desarrollo de nuevas biotecnologías para producir animales transgénicos o para la multiplicación in vitro de líneas de animales genéticamente superiores, se basa en el avance de las técnicas de recuperación de material genético.

La última década del siglo pasado, se caracterizó por ser un período relevante, para el mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales. Así mismo, en los actuales momentos vivimos la era de la clonación y la transgénesis, existiendo muchos estudios dirigidos al mejoramiento de estas herramientas biotecnológicas. Un objetivo valioso del desarrollo de la biotecnología, es la producción in vitro, como base para otras investigaciones cuando son transferidos a hembras receptoras, obteniéndose el nacimiento de crías saludables.

Actualmente, existen dos técnicas estandarizadas (aspiración folicular y slicing) para la obtención de ovocitos las cuales, presentan un cierto porcentaje de recuperación de ovocitos, este porcentaje tiende a ser bajo en como en el caso de las conejas, manifestándose problemas a la hora de obtener su material genético (ovocitos) producto de la dificultad de la manipulación de los ovarios por su consistencia y tamaño, por ello con esta investigación se busca probar un nuevo protocolo denominado exposición folicular y así compararlo con los dos métodos ya existentes (aspiración folicular y slicing) y determinar con cual técnica se aprovecha de mejor manera los folículos para una subsiguiente fertilización in vitro.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar tres técnicas para extracción de ovocitos (aspiración folicular, slicing, exposición folicular) con dos crioprotectores (etilenglicol y polietilenglicol) en conejas (*Oryctolagus cuniculus*) de matadero mediante microscopia para determinar su validez en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar tres técnicas diferentes de extracción de ovocitos en conejas post mortem, mediante la observación microscópica para evidenciar su calidad y cantidad.
- Determinar los efectos de los crioprotectores sobre los ovocitos recuperados, y así evidenciar su eficiencia post congelación.
- Detallar el protocolo idóneo para la obtención de ovocitos en conejas post mortem.

## **HIPÓTESIS**

### **HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

Hi.- Se logrará identificar la eficiencia entre las tres técnicas de extracción de ovocitos (slicing, aspiración folicular y exposición folicular) con dos crioprotectores (etilenglicol y polietilenglicol) en conejas *post mortem*.

### **HIPÓTESIS NULA**

H0.- No se logrará identificar la eficiencia entre las tres técnicas de extracción de ovocitos (slicing, aspiración folicular y exposición folicular) con dos crioprotectores (etilenglicol y polietilenglicol) en conejas *post mortem*.

# CAPÍTULO I

## 1. REVISIÓN DE LITERATURA

En el presente capítulo se trata las principales características anatómicas y fisiológicas del aparato reproductor de la hembra y el tema relacionado al estudio de los ovocitos extraídos de los ovarios.

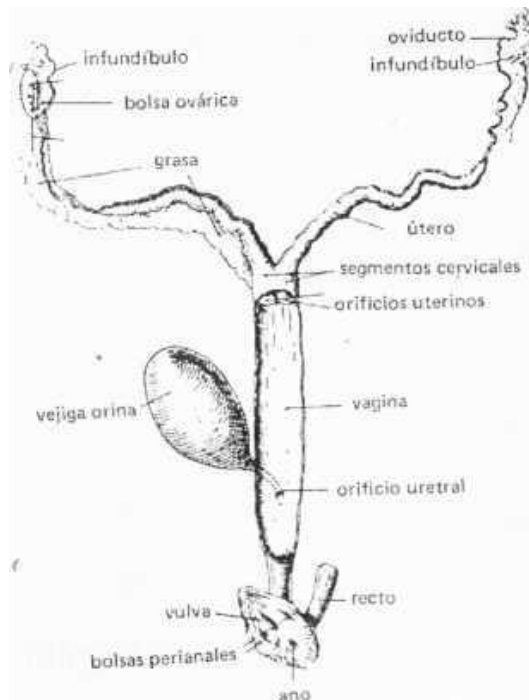
### *1.1. El Conejo*

El conejo común o europeo (*Oryctolagus cuniculus*) pertenece al orden Lagomorpha; su principal aptitud productiva es la cárnica, pues su elevada prolificidad y la brevedad de sus ciclos reproductivos y de engorde le confieren un gran potencial de producción. También se explotan conejos para la obtención de piel (raza Rex), de pelo (raza Angora), como animal de experimentación, como animal de compañía (razas enanas) y para la realización de repoblaciones. (Barbado, 2006)

### *1.2. Anatomía del aparato reproductivo de la hembra*

Las gónadas de la coneja son los ovarios, y para que se pueda llevar a cabo la reproducción hay otros órganos como son: infundíbulos, oviductos, úteros, vagina y vulva. (Alvariano & Ubilla, 2003)

**FIGURA N° 1 APARATO REPRODUCTIVO DE LA CONEJA**



**Fuente:** FRANCO, F, GADELLA M., 1998.

La coneja es un mamífero de ciclo reproductivo corto. Sus cuernos uterinos están completamente separados entre sí, desembocando en la vagina de forma independiente a través de canales cervicales, por lo que no se producen migraciones de embriones de un cuerno a otro. (Alvariño & Ubilla, 2003)

### ***1.2.1. Ovarios***

La coneja posee dos ovarios de aspecto arriñonado, alargados y aplastados con una longitud de 1 a 1,5 cm aproximadamente en el eje más largo, de color blanco amarillento, con un peso que oscila entre 200 y 800 mg, frecuentemente rodeados de grasa y envueltos por un pliegue de peritoneo a través del cual se pueden observar unos abultamientos en la superficie que corresponden a los folículos en

sus diferentes fases de madurez. En torno a los 80 días y bajo estímulos hormonales comienza la actividad cíclica del ovario, que llevará a la maduración de un determinado número de folículos. Estos folículos secretan estrógenos que actúan sobre el útero preparándolo para recibir un óvulo fecundado y el desarrollo de la gestación. (Barbado, 2006)

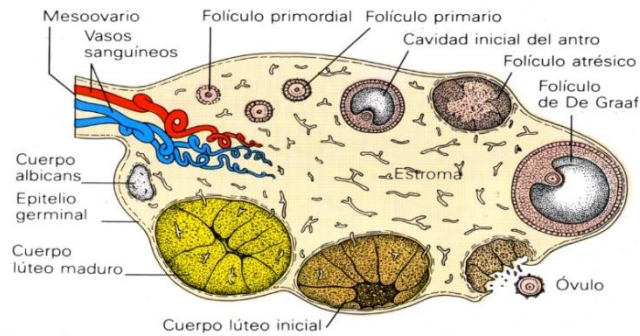
A diferencia del testículo, permanece en la cavidad abdominal, realiza tanto funciones exocrinas como endocrinas, son funcionales en las hembras sexualmente maduras. Las células germinales primordiales se originan fuera de la gónada y emigran a través del mesenterio del saco vitelino hacia las crestas genitales. Presentan dos partes sin separación evidente entre ambas, la externa o corteza y la interna o médula. (Cabodevila & Teruel, 2001)

La corteza presenta un epitelio de superficie plano o cúbico denominado epitelio germinal. A nivel del hilio ovárico, el epitelio se continúa con el mesotelio del repliegue peritoneal. Debajo del epitelio aparece una capa de tejido conectivo fibroso no modelado denominado túnica albugínea y hacia el interior se dispone un tejido conectivo laxo y aparecen los ovocitos (células primordiales femeninas) y los folículos en diferentes fases de evolución.

La médula está constituida por tejido conectivo laxo con fibras musculares lisas y numerosos vasos sanguíneos (grandes y arrollados), vasos linfáticos y nervios. (Cabrera & Fernández, 2006)

#### ***1.2.1.1. Comparación morfológica del ovario en diferentes especies.***

**FIGURA N° 2 ESTRUCTURA DEL OVARIO**



**Fuente:** HAFEZ., 2002.

Al nacimiento, una capa de células foliculares rodea los oocitos primarios en el ovario para formar los folículos primordiales. La forma y el tamaño ováricos varían según la especie y la etapa del ciclo estral. (Azada, 2000)

**CUADRO N° 1 MORFOLOGÍA DEL OVARIO SEGÚN LA ESPECIE**

	VACA	CERDA	OVEJA	CONEJA	YEGUA
<b>Forma</b>	Almendra	Racimo de uvas	Almendra	Ovoide	Arriñonada
<b>Tamaño</b>	3.5 cm largo y 2.5 cm ancho	5 cm largo y ancho	1.5 cm x 1x1 cm	1.5 cm	7-8 cm largo y 3-4 cm ancho

**Fuente:** HAFEZ., 2002.

**1.2.2. Infundíbulo**

Son membranas conjuntivas que poseen prolongadas llamadas fimbrias que realizan la captación o captura del óvulo cuando ha sido expulsado del ovario y están situados junto al ovario. (Arthur, Noakes, & Pearson, 2003)

### ***1.2.3. Oviductos***

Desembocan en los cuernos uterinos y son cortos, finos, flexuosos y blanquecinos de 1 a 2 cm de longitud aproximadamente, con una forma de embudo en la zona próxima a los ovarios. En los mamíferos domésticos, el ovario se encuentra en una bolsa ovárica abierta, a diferencia de lo que ocurre en otras especies (como rata y ratón), en las que se halla en un saco cerrado.

Dicha bolsa consiste en un delgado pliegue peritoneal del mesosálpinx, que está unido a un asa suspendida en la porción superior del oviducto. Es el lugar donde se realiza la fecundación ovular. (Albarrán & Calderón, 2007)

### ***1.2.4. Cuernos uterinos***

Aunque parezca que la coneja posee un cuerpo uterino con dos cuernos, la realidad es que el útero es doble, presentando dos cuernos, dos cuerpos y dos cuellos en forma de conos alargados y flexibles no comunicados entre sí, al contrario que en el resto de las especies domésticas, si bien exteriormente tiene un aspecto similar ya que los cuerpos y los cuellos se encuentran unidos.

La longitud de estos cuernos uterinos es de 7 a 8 cm, cada uno provisto de conductos cervicales abiertos directamente en la vagina y es el órgano encargado de alojar los fetos durante la gestación. (Córdova, Peláez, Domínguez, Peña, & Alegre, 2001)



### ***1.2.5. Cuello uterino***

Es la porción fibromuscular del útero que se proyecta dentro de la vagina y realiza la función de barrera entre el mundo externo, en contacto con la vagina y el ambiente uterino. (Bracket & Siedel, 2005)

### ***1.2.6. Vagina***

Segmento del aparato genital que acoge el órgano copulador del macho; en ella desemboca la uretra para permitir la salida de la orina procedente de la vejiga urinaria. Tiene unas dimensiones de 1 cm de diámetro y unos 7 cm de longitud aproximadamente. (Cabrera & Fernández, 2006)

### ***1.2.7. Vulva***

Está situada debajo de la cola y mide escasamente 1 cm. La coloración de la vulva tiene cierto interés para averiguar las posibilidades de determinación del celo y la aceptación del macho. (Arthur, Noakes, & Pearson, 2003)

Entre las principales funciones que cumplen los órganos reproductores de la hembra tenemos:

## ***1.3. Fisiología de La reproducción En El Conejo***

**CUADRO N° 2 ÓRGANOS REPRODUCTORES DE LA HEMBRA Y SUS  
PRINCIPALES FUNCIONES**

<b>ÓRGANO</b>	<b>FUNCIONES</b>
<b>Ovarios</b>	Producción de ovocitos.
	Producción de estrógenos (folículos de Degraff).
	Producción de progestágenos (cuerpo lúteo).
<b>Oviductos</b>	Transporte de gametos (espermatozoides y óvulos).
	Sitio de fertilización.
<b>Úteros</b>	Retención y alimentación de embrión y feto.
	Previene la contaminación microbiana del feto.
<b>Cérvix</b>	Reservorio para el semen y transporte de esperma.
	Órgano copulador.
<b>Vagina</b>	Sitio de depósito de semen durante el apareamiento natural.
	Conducto del parto.
<b>Vulva</b>	Abertura externa del aparato reproductor.

**Fuente:** GARCÍA, PALENCIA., 2007.

La edad de inicio de la pubertad está mal definida en la coneja, entendiendo por pubertad el momento en que se ovula por primera vez. Muchos son los factores que influyen en este hecho siendo la raza (la pubertad se inicia antes en las razas de tamaño pequeño o mediano) y el desarrollo corporal (la pubertad se alcanza en la mayoría de las hembras cuando estas alcanzan el 80% de su peso vivo adulto), los más importantes. (Hafez, 2002)

La producción de óvulos en las hembras es limitada al contrario de lo que ocurre con los espermatozoides, ya que estos se generan durante toda la vida del macho. La coneja nace con un número de esbozos foliculares que se forman en el período embrionario; a los 13 días de edad de la futura reproductora estos esbozos foliculares dan lugar a los primeros folículos primordiales, que se constituirán en verdaderos folículos alrededor de los 65-70 días. (Córdova, Peláez, Domínguez, Peña, & Alegre, 2001)

Los primeros apareamientos de la coneja pueden observarse a los dos meses y medio, pero conviene recordar que antes de los 80 días es poco frecuente encontrar óvulos maduros y que el rendimiento de las conejas es mejor si se cubre a partir de las 17 semanas de vida. (Cooper & Bedford, 2001)

Un folículo mide aproximadamente 1,5 mm de diámetro y es una estructura que hace relieve sobre la superficie de ovario, en cuyo seno se encuentra, en período de maduración, un ovocito. Llegado el momento de la ovulación, el folículo se rompe y libera el óvulo que es el gameto femenino.

Los fenómenos de maduración de los folículos primordiales, la ruptura de los folículos y la liberación del óvulo así como los signos externos de celo están gobernados por mecanismos hormonales. (Jainudeen, Delaveau, Wahid, & Hafez, 2002)

La diferenciación sexual de los gazapos se produce a los 14 - 15 días de vida embrionaria, es decir, hacia la mitad de la gestación. A partir del primitivo epitelio germinativo, tiene lugar tres formaciones sucesivas:

- Aparición de los cordones ováricos a los 23 días de gestación.
- Formación del epitelio germinativo primordial al día y medio después del nacimiento; esta segunda proliferación da origen a las células germinativas que madurarán en un futuro.
- Producción de los primeros ovocitos entre la 3ra y 4ta semana de edad; estas células serán las que darán lugar a los primeros óvulos fecundables. (Bracket & Siedel, 2005)

Para que una coneja se reproduzca, es necesario que haya alcanzado la pubertad y por tanto que tenga una determinada edad, la edad aconsejable para que una coneja entre en reproducción es, cuando ha alcanzado el 80% de su peso adulto (3,0 Kg.) y esto se obtiene a partir de los 4 meses de edad. Hay que distinguir entre pubertad (capacidad para reproducirse) y madures sexual (máxima potencialidad reproductiva) que se adquiere a partir de los 7 u 8 meses o bien el 2do. ó 3er. parto. (Lim, 2001)

Por otro lado, la reproducción es una "función de lujo", esto quiere decir que un animal no se va a reproducir o no lo hará con toda su potencialidad sí no tiene cubiertas sus necesidades básicas de alimentación, con un aporte energético y vitamínico adecuado; se reproducirá mal si no se encuentra a gusto en su entorno, porque la temperatura no sea la adecuada (muy alta o muy baja), si hay demasiada humedad, sí no tiene la luz suficiente, etc.; tampoco tendrá una función reproductiva optima si su estado general no está en buenas condiciones, porque el animal esté parasitado, enfermo, con tiña, sarna, mal de patas, etc. Las situaciones de stress también alteran la reproducción. (Cervera & Pacual, 2006)

Para que la reproducción se desarrolle con eficacia y sin contratiempos, es preciso que los animales estén sanos. La presencia de enfermedades o dolencias del tipo que sean, aunque cursen de forma subclínica, interfieren seriamente la procreación. (Franco & Gadella, 2000)

### ***1.3.1. El ciclo sexual de la coneja.***

La mayor parte de los mamíferos domésticos presentan fenómenos cíclicos de actividad, los cuales se repiten al final de una fase de actividad sexual máxima denominada celo, estro o calores. La coneja, es un animal que no presenta un ciclo

regular o, por lo menos éste ofrece variaciones muy acentuadas. Para algunos, el ciclo ovárico está muy vinculado a las condiciones ambientales y nutricionales. (Hernandez, 2006)

Se reconocen en la coneja dos fases distintas que pueden denominarse:

- **Fase folicular**
- **Fase luteínica**

La variabilidad con que se presentan los fenómenos sexuales han sugerido dos teorías al respecto: una que niega la existencia de un ciclo ovárico como tal y otra que se muestra partidaria del mismo. (Lim, 2001)

#### ***1.3.1.1. Teoría de la no existencia de un ciclo sexual***

Considerando varias teorías se pensó que la coneja carecía de ciclo estral, afirmando que están en un estado de celo continuo cuando las condiciones nutritivas les son favorables, los ciclos de maduración folicular se producen en oleadas de 7 a 10 días e ininterrumpidamente. (Cooper & Bedford, 2001)

Los folículos tardan 18 días en madurar plenamente y que una vez maduros permanecen vigentes y capaces de ser fecundados durante 7-10 días, pasados los cuales se atrofian; la coneja no presenta una regularidad receptiva, pero sí se dan fechas con mayor porcentaje de aceptación o facilidad para el acoplamiento, comportamiento que oscila según las condiciones de crianza, predisposición genética, ritmo de reproducción, etc. (García García, y otros, 2007)

En condiciones óptimas de crianza, las conejas tienden a presentar celos muy prolongados en el transcurso de los cuales van madurando sucesivamente los folículos, siendo el período de vigencia de los mismos de 12 a 16 días. (Nusshag, 2006)

La discrepancia principal surge cuando se trata la presencia continua o no de folículos maduros dispuestos para la ovulación, pues a pesar de la vigencia de este principio no puede omitirse la evidente presencia de períodos de anestro en determinadas épocas del año o bajo ciertas condiciones. (Cabodevila & Teruel, 2001)

Al no ser la ovulación en esta especie una consecuencia directa de la culminación del desarrollo folicular, la coneja presenta ciclo estral, por lo que se requiere de la estimulación coital para desencadenar la descarga ovulante de GnRH. (Roa, Linares, & Tamasaukas, 2003)

### ***1.3.1.2. Teoría del ciclo estral***

Mantiene que la coneja presenta un ciclo estral de 16-17 días, a lo largo de los cuales sería fecundable durante 13 días. El ciclo dura 16 días, de los cuales resultan fecundables del 2do al 14vo.

La duración de la fase de anestro oscila de 46-48 horas, durante la cual las conejas rechazan sistemáticamente el coito.

La teoría del ciclismo en la coneja se considera que se trata de un ciclo incompleto, pues la ovulación no se da espontáneamente, sino que en realidad es inducida por el contacto sexual; por lo que en definitiva, es un ciclo estral monofásico bloqueado en la fase de celo. (Cooper & Bedford, 2001)

### ***1.3.2. El Celo***

El celo, estro o calores, se define como el período en que la hembra es receptiva al macho y aceptará la cópula. El celo en la coneja, no siempre es tan aparente como en la mayoría de las hembras domésticas, dando lugar a síntomas que pueden presentarse de la siguiente manera (Cole & Cup, 2006):

#### ***1.3.2.1. Cambio de conducta***

La coneja se muestra inquieta, agresiva, roe la jaula, frota el mentón contra la malla de la jaula, presenta el dorso ligeramente arqueado o el rabo levantado, y si hay varias hembras juntas se montan entre ellas.

Aunque si bien, estas actitudes se presentan en muchas conejas en celo, no se dan en todas las ocasiones, ni siempre con la misma intensidad. (Jainudeen, Delaveau, Wahid, & Hafez, 2002)

#### ***1.3.2.2. Actitud con el macho***

Situada con el macho, la coneja se aviene enseguida a la cópula. (Laing, W. J., & W. C., 2006)

#### ***1.3.2.3. Color de la vulva***

Se ha podido llegar a una relación entre el color vulvar y los saltos fecundos, comprobándose que la máxima aceptación y resultados se lograban cuando era de color rojo pues se encuentre tumefacta debido a una irrigación sanguínea intensa. Aunque hay que anotar que muchas veces conejas con vulva de aspecto seco y de color pálido aceptan perfectamente al macho. (Hasler, 2002)

**CUADRO N° 3 PORCENTAJE DE SALTOS FECUNDOS SEGÚN EL COLOR VULVAR.**

<b>COLOR</b>	<b>Blanco</b>	<b>Sonrosado</b>	<b>Rojo</b>	<b>Violáceo</b>
<b>Tasa de aceptación (%)</b>	0	20	80	50

**Fuente:** VALENCIA M. R., 2004.

Las manifestaciones externas que indican el celo en la coneja se limitan al aumento de la turgencia y coloración de los labios vulvares. (Fernández, 2000)

### ***1.3.3. La ovulación***

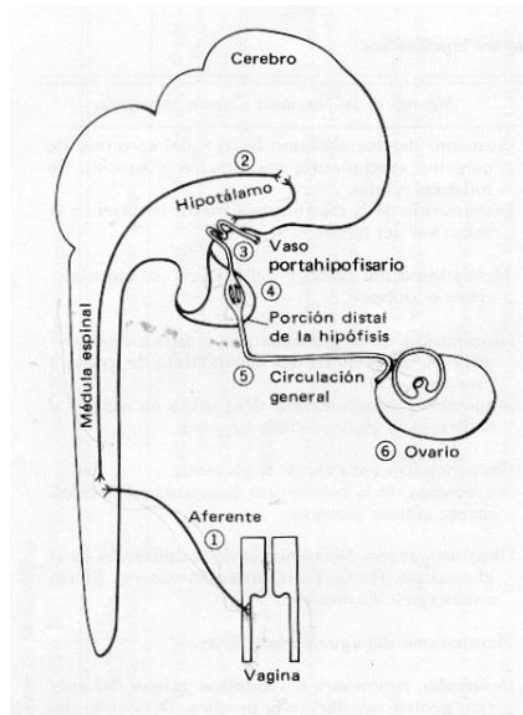
Se sabe desde hace tiempo que el coito de la coneja actúa como inductor de la ovulación. Experiencias anatómicas y fisiológicas han demostrado que la ovulación es en la coneja un acontecimiento fisiológico para cuya culminación intervienen los sistemas nervioso y endocrino.

Cuando más de una hembra se encuentra en celo, se montan entre ellas produciéndose el conocido fenómeno de la pseudogestación, lo que retrasarían la entrada reproductiva de dichas hembras. (García García, y otros, 2007)

La coneja presenta características reproductivas diferentes a otras especies derivadas de la ausencia de un ciclo estral definido y regular ya que, la ovulación es inducida por el coito más que por el “feedback” positivo de los estrógenos. Este genera un reflejo neuroendocrino que estimula la liberación de la hormona



**FIGURA N° 3 OVULACIÓN EN LA CONEJA**



**Fuente:** BRACKET, 2005.

liberadora de gonadotropinas, (GnRH, Gonadotropic Releasing Hormone) por el hipotálamo, con la consiguiente descarga preovulatoria de la hormona luteinizante (LH, Luteinizing Hormone) lo que desencadena el proceso de maduración del oocito y la ovulación. (Ruiz & Correa, 2007)

La introducción de la ciclicidad de la producción y la inseminación artificial (IA) en “bandas” o en días fijos de la semana han mejorado de manera significativa el manejo y la productividad en las granjas cunícolas.

Debido a las características particulares de esta especie, es necesario aplicar métodos de inducción de la ovulación, mediante la administración de análogos sintéticos de GnRH por vía intramuscular en el momento de la IA. (Azada, 2000)

#### ***1.4. Aspectos fisiológicos de la reproducción***

La reproducción en las hembras es un complejo proceso, regulado a tres niveles: cerebro, ovario y útero. Ahora vamos a suponer que tenemos a una hembra joven

que no ha entrado todavía en reproducción y por tanto a nivel del cerebro está en reposo sexual, los ovarios también están en reposo, estando situados a nivel de la 4a vértebra lumbar, presentando el tamaño de una almendra pelada. (Alvariño & Ubilla, 2003)

En el interior de este ovario se encuentran los ovocitos o gametos femeninos en un número constante en cada hembra, cada uno de estos gametos está dentro de una especie de cápsula en el ovario que se denomina folículo.

Cuando introducimos a esta hembra en la nave de maternidad, esta se estimula por la observación de sus vecinas y por el olor de los machos. En el cerebro de esta coneja se produce una hormona llamada FSH que va a actuar sobre los ovarios que estaban en reposo, haciendo que un determinado número de folículos aumente de tamaño y se vayan aproximando a la superficie del órgano. (Córdova, Peláez, Domínguez, Peña, & Alegre, 2001)

Cuando estos folículos alcanzan su máximo volumen hacen relieve sobre la superficie del ovario. El líquido que hay en el interior de estos folículos. Entre la ovulación y el parto existe una fuerte pérdida de embriones; la mortalidad embrionaria se considera está comprendida entre el 20 y el 30 % de los óvulos fecundados. (Cabodevila & Teruel, 2001)

Este fenómeno se acentúa a partir del cuarto parto. Produce unas sustancias que son los estrógenos, también denominados hormonas femeninas que informan a la hembra que ya está preparada para la maternidad, haciendo que se presenten las manifestaciones del celo en la coneja, que la vulva adquiera coloración roja y que la hembra acepte al macho. (Hernandez, 2006)

En el momento de la cubrición, se producen estímulos emocionales generales y estímulos locales a través de receptores localizados en el área genital (flor radiada de los Cervix) que llegan al cerebro, el cual produce otra hormona llamada LH que hace que se dejen de producir estrógenos y desaparezcan las manifestaciones de celo y que el folículo prominente se rompa y el gameto salga al exterior del ovario, a este fenómeno se le conoce como ovulación provocada o inducida, sin el coito u otro motivo de ovulación.

La actividad ovárica se reduce a períodos de crecimiento y regresión folicular donde los folículos degeneran y desaparecen en el interior del ovario sin llegar a eclosionar. (Jainudeen, Delaveau, Wahid, & Hafez, 2002)

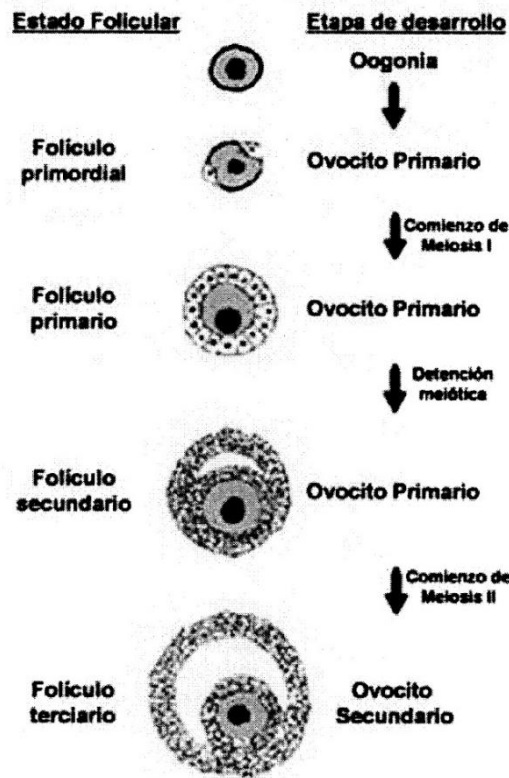
## ***1.5. Fisiología ovárica de la hembra***

### ***1.5.1. Ovogénesis***

Es la gametogénesis femenina, es decir, el desarrollo y diferenciación del gameto femenino u óvulo mediante una división meiótica y se lleva a cabo en los ovarios. Este proceso se produce a partir de una célula diploide y se forman como productos una célula haploide funcional (el óvulo) y tres células haploides no funcionales (los cuerpos polares). (Cabrera & Fernández, 2006)

Las células del organismo poseen una dotación genética compuesta por 46 cromosomas. Las células germinales poseen sólo 23. Al unirse tras la fecundación un ovocito con 23 cromosomas y un espermatozoide con 23 cromosomas darán lugar a un embrión con células de 46 cromosomas. (Fernández, 2000)

## **FIGURA N° 4. DIAGRAMA DE LA OOGÉNESIS**



**FUENTE:** Hernandez, A, 2006.

En la mayoría de los mamíferos, la ovogénesis comienza durante la vida embrionaria y la transformación de las oogonias (células diploides) en ovocitos (células haploides) se completa antes del nacimiento. En la coneja, la ovogénesis se inicia al nacimiento y las oogonias comienzan la meiosis y se transforman en ovocitos durante los primeros 10 días de vida. (Lim, 2001)

En la tercera semana de edad, el ovario ya presenta folículos primordiales y folículos en desarrollo, mientras que los primeros folículos antrales se detectan a partir de la 12 va semana de vida. (Palma, 2003)

De esta forma, en las primeras semanas después del nacimiento, la coneja ya contará con la dotación de ovocitos disponibles para el resto de su vida reproductiva. A

partir de aquí, se producen oleadas de crecimiento folicular (foliculogénesis) y regresión (atresia) de manera constante, aunque el núcleo del ovocito permanecerá detenido en el estadio de diploide de la profase de la primera división meiótica, estadio nuclear que mantendrá hasta pocas horas antes de la ovulación. (Rebollar, Lorenzo, Carneiro, & Liu I., 2001)

### ***1.5.2. Crecimiento folicular***

Representa una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares de diversos componentes del folículo: el ovocito, granulosa y teca, regidas por varios factores intraovaricos e intrafoliculares, y señales hormonales que conducen a la secreción de andrógenos y estrógenos. (Fernández, 2000)

En el crecimiento folicular intervienen la proliferación y la diferenciación (inducidas por hormonas) de células de la teca y de la granulosa, lo que finalmente causa un incremento en la capacidad de los folículos de producir estradiol y de reaccionar a las gonadotropinas. (Hafez, 2002)

La producción de estradiol determina cuál folículo adquirirá los receptores de LH necesarios para la ovulación y la luteinización. Las perturbaciones en la respuesta de la granulosa y teca a las señales gonadotropínicas interrumpen el crecimiento folicular e inician la atresia. (Nusshag, 2006)

Sin embargo, a lo largo de la foliculogénesis, la maquinaria molecular del ovocito está activa. El nucléolo presenta una estructura fibrogranular que refleja la actividad sintética del ovocito durante su crecimiento. En este periodo, sintetiza y almacena

grandes cantidades de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas que es a lo que se debe su aumento de tamaño. (Ramón, Rabel, & Piles, 2004)

Durante la foliculogénesis se pueden definir folículos en cinco estadios morfológicos, que a su vez, se pueden agrupar en relación al momento en el que se forma el antro folicular en: folículos preantrales (primordiales, primarios y secundarios) y antrales (terciarios y preovulatorios) (Bracket & Siedel, 2005):

#### ***1.5.2.1. Folículo primordial.***

Es la primera fase de evolución folicular del ovocito, está constituido por un ovocito rodeado de un epitelio simple plano, que descansa sobre una membrana basal, tiene un núcleo excéntrico grande y vesiculoso, con un nucléolo muy desarrollado. El ovocito se encuentra rodeado de una capa de células planas conectadas entre sí y al ovocito mediante las uniones “gap”, las cuales permiten el intercambio de pequeñas moléculas, señales y nutrientes. El diámetro del folículo y del ovocito en este estadio en la coneja está en torno a 30-44  $\mu\text{m}$ . (Nusshag, 2006)

#### ***1.5.2.2. Folículo primario.***

Se caracteriza porque se produce un aumento de tamaño en el ovocito y las células foliculares pasan de ser planas a cúbicas. El folículo tiene un diámetro de unos 100-120  $\mu\text{m}$ . Las células foliculares planas que rodean al ovocito en crecimiento se transforman en una capa de células cúbicas. La membrana basal que rodea al folículo aumenta de grosor y se denomina lámina limitante externa. Las células del estroma circundante del folículo se van diferenciando y concentrando alrededor de la limitante externa constituyendo la teca. En el límite entre el ovocito y las células de la granulosa se forma un espacio denominado zona pelúcida, que esta relleno por

una sustancia glicoproteica PAS, secretada por las células de la granulosa y posteriormente, también por el ovocito. (Hernandez, 2006)

Hacia esta zona se proyectan las microvellosidades del oocito y las de las células de la granulosa para favorecer el intercambio de elementos. El ovocito de la coneja experimenta un gran crecimiento llegando a medir alrededor de 60  $\mu\text{m}$ . (García García, y otros, 2007)

### ***1.5.2.3. Folículo secundario o preantral.***

Se caracteriza porque se produce un aumento de las células de la granulosa, que inician la secreción de líquido folicular que forma cavidades y espacios intercelulares. Los espacios intercelulares van aumentando de tamaño y número y confluyendo, dando lugar a una cavidad principal denominada antro folicular, por lo que a este folículo también se le denomina antral. (Roa, Linares, & Tamasaukas, 2003)

En esta fase el ovocito alcanza su tamaño máximo. El folículo mide unos 200  $\mu\text{m}$  de diámetro medio. Consta de un ovocito que alcanza casi su tamaño máximo (80-104  $\mu\text{m}$ ), con dos o más capas de células de la granulosa alrededor que se multiplican rápidamente; comienzan a desarrollarse las células de la teca y su vascularización. (Barbado, 2006)

### ***1.5.2.4. Folículo terciario o antral.***

Estos folículos en la coneja tienen un diámetro superior a 200-250  $\mu\text{m}$  según distintos autores. Aparecen espacios ocupados por líquido folicular, producidos por el metabolismo de las células foliculares, los cuales van formando una cavidad

llamada antro folicular. El ovocito crece hasta unos 133-135  $\mu\text{m}$  y presenta de seis a nueve capas de células de la granulosa. (Franco & Gadella, 2000)

#### ***1.5.2.5. Folículo preovulatorio o de Graaf.***

Es el folículo preparado para la ovulación, por ello se le denomina folículo maduro. Conforme el antro va creciendo, el ovocito se ve desplazado excéntricamente y se sitúa en una acumulación de células de la granulosa denominada cumulus ooforus. Las células de la granulosa que se disponen alrededor del ovocito constituyen la corona radiada. En la coneja, estos folículos tienen un diámetro superior a 800-900  $\mu\text{m}$  y el ovocito mide entre 140-143  $\mu\text{m}$ . (Hasler, 2002)

El antro aumenta de tamaño y acumula gran cantidad de factores de crecimiento, hormonas peptídicas y esteroideas, proteínas, metabolitos energéticos y otras sustancias desconocidas. (Ramón, Rabel, & Piles, 2004)

Las células de la teca interna y externa están completamente formadas. Durante este periodo, el ovocito apenas aumenta su tamaño produciéndose el crecimiento de los folículos antrales principalmente por el acúmulo de líquido folicular. (Rebollar, El aparato reproductor de la coneja y su ciclo hormonal. Sincronización y bioestimulación, 2000)

#### ***1.5.3. Maduración del óvulo***

Antes de que se produzca la ovulación y la posterior fecundación, si se produce, debe terminar la meiosis. Esta comienza en las fases tempranas del desarrollo fetal. Los oocitos primarios provenientes de la división de las células germinales primordiales entran en profase de la primera división meiótica y se detienen en el diploteno, reanudándose en los oocitos de los folículos maduros, dando lugar a los oocitos secundarios. La división separa



de nuevo en la metafase de la segunda división meiótica, terminándose rápidamente en el caso de que haya fecundación.

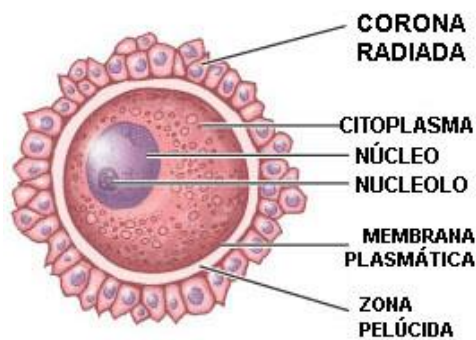
## **1.6. Ovocito**

En organismos animales, los gametos proceden de una estirpe celular específica llamada línea germinal que da lugar a las células germinales primordiales y que en etapas tempranas del desarrollo se diferencian y originan ovocitos (u oocitos) y espermatozoides. Los ovocitos presentan un tamaño medio de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro en el ratón y de 100  $\mu\text{m}$  en el ovocito humano. Los ovocitos de mamíferos se encuentran rodeados de varias capas de células que constituyen el cúmulo oóforo. (Franco & Gadella, 2000)

El grado de crecimiento ovocitario se relaciona directamente con el número de células de la granulosa que lo rodean. También se ha propuesto que las células del cúmulo, después de la maduración del ovocito, pueden ayudar a guiar al espermatozoide hacia el ovocito justo antes de la fecundación, aunque no ha llegado a demostrarse este extremo.

La ruptura de las células del cúmulo se lleva a cabo por diferentes enzimas liberadas por los espermatozoides. (Roca, Hill & White, Viudes de Castro, & Vicente, 2009)

### **FIGURA N° 5 ESTRUCTURAS DEL OVOCITO**



**Fuente:** PALMA, G. 2003.

En cuanto a la estructura celular del ovocito en su etapa más temprana de crecimiento, la mayoría de los orgánulos subcelulares se encuentran agrupados alrededor del núcleo en el ooplasma o citoplasma del ovocito formando lo que se conoce como corpúsculo de Balbiani o núcleo de yolk. A partir de este estadio inicial los orgánulos presentan un periodo de intensa actividad de síntesis de RNA que va cesando gradualmente a lo largo del crecimiento, pudiendo aumentar de volumen 150 veces en el ratón desde el ovocito primordial al estado. (Arthur, Noakes, & Pearson, 2003)

El nucléolo pasa de un estado difuso y de aspecto reticular a un estado más denso y uniforme. Con el crecimiento del ovocito aumenta el número de ribosomas y de mitocondrias. (Azada, 2000)

### ***1.6.1. Estructura del ovocito***

#### ***1.6.1.1. Zona pelúcida***

Se denomina zona pelúcida (ZP) a la capa externa que rodea el ovocito de los mamíferos en el folículo de Graaf, separándolo del espacio perivitelino.

Está compuesta por varias glicoproteínas agrupadas en tres familias: ZP1, ZP2 y ZP3, según sus propiedades inmunológicas y funcionales, y tiene un espesor total de 0.015-0.020 mm. (Cooper & Bedford, 2001)

#### **1.6.1.2. Membrana plasmática**

La membrana plasmática o celular es una estructura laminar que engloba a las células, define sus límites y contribuye a mantener el equilibrio entre el interior (medio intracelular) y el exterior (medio extracelular) de éstas.

Además, se asemeja a las membranas que delimitan los orgánulos de células eucariotas. (Franco & Gadella, 2000)

#### **1.6.1.3. Pronúcleo ovular**

El pronúcleo es el núcleo de los gametos. Posee la mitad del número de cromosomas de los núcleos de las otras células no reproductivas.

Durante la fecundación los pronúcleos de un óvulo y al menos un espermatozoide se fusiona para crear el núcleo único del cigoto. (Nusshag, 2006)

#### **1.6.1.4. Gránulos corticales**

Gránulo vesicular, de un diámetro de 0,3 a 0,5 micras, que se encuentra bordeando toda la superficie interna del ovocito y que, tras la fecundación, se fusiona con la membrana plasmática, liberando un contenido que da lugar a lo que se llama reacción cortical, para formar la membrana de fecundación, evitando así la entrada de nuevos espermatozoides y, por tanto, la polispermia. (Hafez, 2002)

#### 1.6.1.5. *Espacio perivitelino*

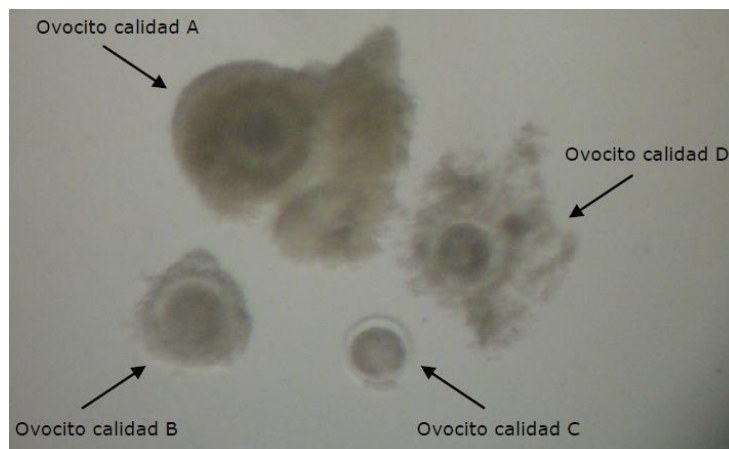
Espacio que queda entre el ovocito y la zona pelúcida que lo envuelve, de un grosor aproximado de entre 0,2 y 0,4 micras. (Cabodevila & Teruel, 2001)

#### 1.6.1.6. *Clasificación de los ovocitos*

Se los puede clasificar en cuatro tipos:

- **Tipo A:** ovocito con células de cumulus con capas múltiples mayor a 4, compactas y con citoplasma homogéneo y transparente.
  - **Tipo B:** capas múltiples de cumulus de 1 a 3 con citoplasma homogéneo y zonas periféricas oscuras.
  - **Tipo C:** cumulus desnudado con citoplasma irregular con zonas oscuras.
- (Palma, 2003)

**FIGURA N° 6. TIPOS DE OVOCITOS POR SU CALIDAD**



**Fuente:** LAING J.A.; W.J. Brinley Morgan; W.C. Wagner; 2006.

### **1.7. Estado madurativo de los ovocitos**

Estructuralmente el ovocito maduro mide entre 110-115 micras y está rodeado de una membrana llamada oolema. Esta membrana contiene el citoplasma del ovocito u ooplasma, donde se encuentran las organelas citoplasmáticas y el núcleo. Rodeando al conjunto ovocito-ooolema está la llamada zona pelúcida, que es de naturaleza glicoproteica y tiene un grosor de 15-20 micras que disminuye tras de la fecundación. (Ruiz & Correa, 2007)

El conjunto ovocito-zona pelúcida mide aproximadamente 150 micras. Entre el oolema y la zona pelúcida está el espacio perivitelino, en el que se encuentra el corpúsculo polar. (Fernández, 2000)

La presencia de un corpúsculo polar (CP) indica que la maduración nuclear ha finalizado. Se cree que hace falta un breve intervalo de tiempo tras la extrusión del primer CP, para que el citoplasma madure completamente. Un ovocito puede ser meioticamente maduro pero no haber alcanzado la madurez citoplasmática, lo que puede llevar a fallos o defectos en la fecundación. (Jainudeen, Delaveau, Wahid, & Hafez, 2002)

Los ovocitos recuperados tras la punción folicular están rodeados de células de la granulosa que forman el *cumulus ooforus*. Estas células son imprescindibles para la reanudación de la meiosis. La capa más interna constituye la corona radiata.

Tradicionalmente, la valoración de la maduración del ovocito se ha basado en el grado de expansión del cumulo y la corona que lo rodea:

- Metafase II: células del cumulo expandidas y luteinizadas.
- Metafase I: células del cumulo menos expandidas.
- Pro fase I: células del cumulo compactadas. (Ruiz & Correa, 2007)

## ***1.8. Métodos para la obtención de ovocitos.***

Se maximiza el número de ovocitos de buena calidad recuperados de ovarios y que pueden ser usados para la maduración, fecundación y cultivo in vitro.

Se extrae de los ovarios de animales faenados los mismos que proporcionan abundantes ovocitos de diferentes etapas reproductivas. (Palma, 2003)

### ***1.8.1. Aspiración de líquido folicular***

Se absorbe con la ayuda de agujas hipodérmicas, luego ser colocadas en cajas Petri para su posterior observación en el microscopio determinando la calidad de la muestra. (Shively, 2008)

### ***1.8.2. Corte de ovarios (Slicing)***

Consiste en hacer cortes finos en los ovarios con la ayuda de un bisturí de afuera hacia dentro colocando el material folicular en solución salina con una temperatura óptima y depositándola en una caja Petri lista para su traslado. (Ruiz & Correa, 2007)

### ***1.8.3. Método de exposición folicular.***

Se trata de cortar con ayuda de un bisturí el folículo dejando toda la estructura a la vista, colocarla en una caja Petri para su evaluación y con ayuda del bisel de la jeringa de insulina se procede a extraer el ovocito.

## ***1.9. Crioprotectores***

Los crioprotectores (CP) son sustancias utilizadas para la protección de células o tejidos del daño que se produce durante el proceso de congelación y descongelación debido principalmente a la formación de hielo.

Los CP alteran las propiedades físico-químicas de las soluciones. Son moléculas hidrosolubles y de baja toxicidad que actúan disminuyendo el punto eutéctico de las soluciones (disminuyen la temperatura a la que se produce la transición del agua de estado líquido a sólido) interactuando con las moléculas de agua al reducir su capacidad de formar enlaces entre ellas. También actúan estableciendo puentes de hidrógeno con otras moléculas biológicas evitando que pierdan su estructura fisiológica original y por lo tanto su viabilidad (Bajo y Coreleu, 2009).

Los crioprotectores se encuentran clasificados como muestra a continuación en permeables y no permeables: según tengan o no capacidad para atravesar la membrana celular (Celestinos y Gatica, 2002).

**CUADRO N° 4 CRIOPROTECTORES MÁS UTILIZADOS EN  
REPRODUCCIÓN ASISTIDA PARA ÓVULOS Y EMBRIONES DE  
DISTINTAS ESPECIES**

<b>Crioprotector</b>	<b>Tipo de célula</b>	<b>Especies ejemplo</b>
<b>PERMEABLES</b>		
Dimetilsulfóxido	Óvulos, embriones	Ratón, humano, vaca
Etilenglicol	Óvulos, embriones	Ratón, conejo, cerdo, rata
Butilenglicol	Óvulos, embriones	Ratón, humano, ovejas
Polietilenglicol	Óvulos, embriones	Ratón, humano, vaca
Glicerol	Óvulos, embriones	Ratón, oveja, humano, rata
Eritriol	Embriones	Rata
Arabitol	Embriones	Rata
Perseitol	Embriones	Rata
Xylitol	Embriones	Rata
<b>NO PERMEABLES</b>		
Sacarosa	Óvulos, embriones	Ratón, humano, vaca
Trehalosa	Óvulos, embriones	Ratón, humano, caballo, vaca
Rafinosa	Óvulos	Ratón, caballo
Dextrano	Embriones	Gato, ratón, Conejo
Ficoll	Óvulos, embriones	Ratón, humano, vaca
Polivinilpirrolidona	Embriones	Ratón
Polivinilalcohol	Óvulos, embriones	Ratón, vaca, oveja
Ácido hialurónico	Embriones	Ratón, vaca, oveja, cerdo

**Fuente:** SWAIN J.E. and SMITH G.D. (2010).

**1.9.1. Crioprotectores permeables.**

Son generalmente compuestos de bajo peso molecular, no-iónicos con una elevada solubilidad en agua a bajas temperaturas difundiendo a través de las membranas celulares reemplazando el agua intracelular. Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma.



### ***1.9.1.1. Etilenglicol.***

La eficacia del etilenglicol como crioprotector ha sido ampliamente descrita y se han realizado diferentes estudios para tratar de determinar las concentraciones óptimas y los tiempos de exposición. Hotamisligil et al.(1996) vitrificaron ovocitos de ratón con una concentración 6 M de etilenglicol y 0,5 M de sacarosa no encontrando diferencias significativas entre los ovocitos vitrificados y los control en el porcentaje de blastocistos obtenidos. Otoi et al. (1997) observaron un mayor porcentaje de supervivencia y de blastocistos vitrificando ovocitos bovinos con un 40% de etilenglicol y una dilución en tres pasos. Isachenko et al. (2001) obtuvieron un 22% de ovocitos en estadio de MII después de vitrificar ovocitos porcinos en estadio de vesícula germinal utilizando un 40% de etilenglicol.

### ***1.9.2. Crioprotectores no permeables.***

Los crioprotectores no permeables no son capaces de atravesar la membrana plasmática debido a su elevado peso molecular y a su compleja estructura. Además, no presentan efecto crioprotector por si solos. Su principal función crioprotectora es la de elevar la presión osmótica, disminuyendo, de esta forma, la cantidad requerida de crioprotector permeable y su toxicidad, y favoreciendo así la deshidratación de la célula (Shaw et al., 1997). Dentro de este grupo se encuentran los azúcares tales como la glucosa, la fructosa, la sacarosa, la trealosa y la lactosa. Estas macromoléculas son capaces de extraer el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica pero sin penetrar en la célula. Diferentes estudios han evidenciado que estas moléculas son capaces de encapsular al ovocito o embrión en una matriz viscosa previniendo la cristalización intracelular durante la descongelación (Kuleshova et al. , 1999) y actuando como tampón osmótico al reducir el choque osmótico que podría resultar de la dilución del crioprotector (Liebermann et al. , 2002).

### ***1.9.2.1. Polietilenglicol***

El polietilenglicol (PEG) es un agente crioprotector no penetrante que a concentraciones molares reducidas confiere un efecto crioprotector usando velocidades lentas de congelación. Ejerce su acción disminuyendo no sólo la formación de hielo tisular, sino también favoreciendo la deshidratación celular, factor muy importante para la tolerancia a la congelación. Los malos resultados iniciales hicieron abandonar su uso, pero con modificaciones en su concentración, velocidad de enfriamiento y temperatura de almacenamiento se obtienen buenos resultados a nivel experimental, lo que supone una esperanza para su uso en humanos. (Gutiérrez Carretero, y otros, 2000)

## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se describe las características de la ubicación geográfica en donde se realizó el estudio, los materiales y equipos utilizados para su desarrollo, los métodos y técnicas aplicadas.

#### *2.1. Ubicación de la investigación.*

##### *2.1.1. Ubicación Política.*

**Provincia:** Cotopaxi.

**Cantón:** Latacunga.

**Parroquia:** Eloy Alfaro.

**Barrio:** Salache Bajo.

**Sector:** Rural

### ***2.1.2. Ubicación Geográfica***

**Latitud:** 0°59'47.68"S

**Longitud:** 78°31'9.16"W

**Altitud:** 2757.591 m.s.n.m

### ***2.1.3. Datos meteorológicos.***

**Temperatura promedio:** 10.7 °C

**Pluviosidad:** 175 mm anuales

**Horas luz/día:** 12 horas

**Viento:** Sureste-Noreste

**Nubosidad anual:** 4.7/8.

**Fuentes:** Registros administración CEYPSA/2007

## ***2.2. Recursos materiales.***

Los materiales que se utilizaron fueron:

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

- Libreta.
- Resma de hojas
- Esferográficos
- Anillados.
- Cd.

- Papel bond.
- Copias.
- Impresiones.
- Empastados.

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

- Calculadora.
- Cámara fotográfica.
- Flash memory.
- Internet.

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

- Mandil.
- Guantes.
- Cofia.
- Mascarilla.
- Ropa quirúrgica.
- Jeringuillas.
- Estereomicroscopio (NIKON SMZ 745).
- Micropipetas.
- Cloruro de sodio al 0.9%.
- Cajas Petri.
- Bisturí.
- Bolas de sellado de pajuelas.
- Goteros.
- Crioprotector etilenglicol (bioniche).
- Crioprotector polietilenglicol (bioniche)
- Solución Holding (minitub).
- Pajillas de 0.25
- Crioconservadora (Cryobath)

- Termo de nitrógeno líquido (SEMEX).
- Tapones de pajuelas de embriones.

#### ***2.2.4. Material biológico***

- Ovocitos

#### ***2.2.5. Animales***

- 18 conejas de las cuales se obtuvieron los ovarios.

### ***2.3. Tipo de investigación.***

#### ***2.3.1. Experimental***

La investigación experimental se presenta mediante la manipulación de variables experimental no comprobadas, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular; en este caso la interacción entre técnicas de obtención de los ovocitos y crioprotectores

### ***2.4. Metodología.***

La metodología que se aplicó es el método experimental aquí se manipula una o más variables de estudio, para controlar el aumento o disminución de esas variables y su efecto en las conductas observadas. Dicho de otra forma, un experimento consiste en hacer un cambio en el valor de una variable (variable independiente) y observar su efecto en otra variable (variable dependiente). Esto se lleva a cabo en

condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular. (Murillo, 2010)

Los métodos experimentales son los adecuados para poner a prueba hipótesis de relaciones causales es por ello que con esta metodología se realizó la manipulación de variables independientes en este caso las tres técnicas de obtención de ovocitos (aspiración folicular, slicing, exposición folicular) además de los dos crioprotectores (etilenglicol, polietilenglicol), para observar efectos en cuanto a su cantidad y calidad pre y post congelación.

#### ***2.4.1. Métodos***

Los métodos que se emplearon para desarrollar la presente investigación fueron: el método inductivo y el método deductivo

En el método inductivo el investigador tiene la posibilidad de examinar el comportamiento de una variable, cada vez que éste produce cambios voluntarios en otra, que supuestamente se encuentra asociada a la primera. Mientras que el método deductivo consiste en aplicar los principios descubiertos a casos particulares, a partir de un enlace de juicios, para encontrar principios desconocidos a partir de los conocidos y para descubrir consecuencias desconocidas de principios conocidos. (Martínez Acurio, 2012)

En esta investigación el método inductivo permitió obtener información a partir de la examinación de las variables (técnicas de obtención de ovocitos y crioprotectores) al intervenir en ellas y como estas producen cambios sobre las otras variables (cantidad y calidad pre y post congelación). Mientras que el método

deductivo permitió desarrollar una teoría de la investigación que inició por formular una hipótesis básica y luego se dedujo los resultados del experimento con la ayuda de la teoría formal.

#### ***2.4.2. Técnicas***

La observación fue la técnica empleada en esta investigación la cual consiste en examinar directamente algún hecho o fenómeno según se presenta espontáneamente y naturalmente, teniendo un propósito expreso conforme a un plan determinado y recopilando los datos en una forma sistemática. Consiste en apreciar, ver, analizar un objeto, un sujeto o una situación determinada, con la orientación de un guía o cuestionario, para orientar la observación.

Por esto se aplicó este método para el estudio de la evaluación de las tres técnicas para extracción de ovocitos en conejas ya que es una biotecnología reproductiva que representa una mejora notable de los recursos cunicultores al permitir combinar diversos procesos y técnicas para la conservación de un alto potencial genético en conejas.

### ***2.5. Diseño experimental.***

En este trabajo de investigación se empleó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial A\*B ya que se evaluó 3 técnicas con 2 crioprotectores y 3 observaciones. Para la interpretación de los resultados se usó el análisis de varianza (ADEVA) y la prueba de Duncan si hubo diferencia significativa para los tratamientos.



**CUADRO N° 5 ESQUEMA DEL ANÁLISIS DE VARIANZA (ADEVA)**

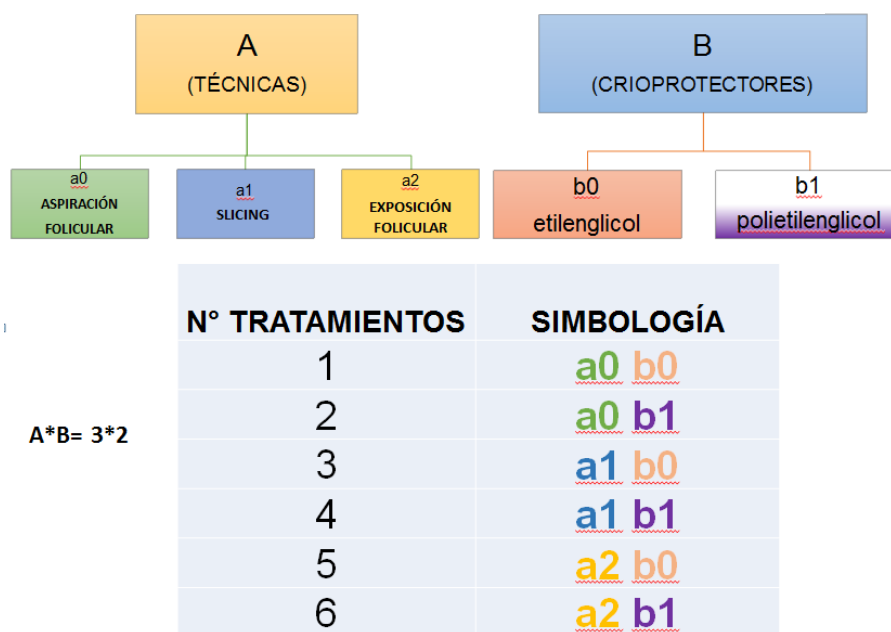
FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
<b>TOTAL</b>	17
<b>A (TÉCNICAS)</b>	2
<b>B (CRIOPROTECTORES)</b>	1
<b>A*B (TÉCNICAS *CRIOPROTECTORES)</b>	2
<b>ERROR EXPERIMENTAL</b>	12

FUENTE: Directa

ELABORADA POR: Juan Paredes, 2015

**2.5.1. Tratamientos.**

**FIGURA N° 7 TRATAMIENTOS**



FUENTE: Directa

ELABORADA POR: Juan Paredes, 2015

**2.5.2. Unidades experimentales**

La unidad experimental se obtuvo de una población de 18 animales hembras, de segundo parto. Se lograron a partir de ovarios recuperados provenientes de animales

que fueron sacrificados para su posterior traslado al laboratorio. En donde, los ovocitos fueron recolectados a través de tres técnicas de obtención folicular (aspiración folicular, slicing, exposición folicular) para su observación y posterior clasificación.

## **2.6. Manejo del ensayo**

Para realizar esta investigación se inoculó a las conejas previamente a su faenamamiento (12Hrs) GnRH intramuscular con una dosis de 0.2 ml, ya que es necesario realizar una estimulación.

Se realizó el siguiente protocolo que se describe a continuación:

- Selección de animales en el camal.
- Inoculación de GnRh sintética (0.2 ml) intramuscular.
- Sacrificio de los animales 12 horas después de la inoculación.
- Recolección de los ovarios de los animales faenados.
- Una vez extraídos se colocan en un termo con cloruro de sodio al 0.9% con la finalidad de mantener intactas las estructuras.
- Traslado del material biológico en el transcurso de 2 horas.
- Una vez en el laboratorio se procedió a retirar las estructuras anexas de los ovarios que aún estaban impregnadas como ligamentos, tejido adiposo, fascias.
- Posteriormente se realizó un lavado adicional de los ovarios con el objetivo de quitar las impurezas restantes.

### **a. Método de aspiración.**

Se introdujo el bisel de la jeringa dentro de cada uno de los folículos prosiguiendo a su aspiración para luego depositar el líquido folicular en una caja Petri junto con medio Holding para identificar ovocitos.

### **b. Método de slicing.**

Se procedió a realizar un corte transversal en el ovario con la ayuda de un bisturí número 15.

Se hicieron lavados retrógrados del ovario seccionado con solución holding y el contenido con el líquido folicular se depositó en una caja Petri para su subsiguiente evaluación.

### **c. Método de exposición folicular.**

Se cortó con ayuda de un bisturí el ovario extrayendo el folículo completo, se colocó en una caja Petri para su evaluación en el estereomicroscopio y con ayuda del bisel de la jeringa de insulina se procedió a extraer el ovocito.

### **Evaluación de la cantidad, calidad y madures de ovocitos.**

- Se llevó al estereomicroscopio para realizar la selección de los ovocitos garantizando un óptimo resultado categorizándolos de la siguiente manera: TIPO: A, B y C tomando en cuenta las siguientes características:

Tipo A: ovocito con células de cumulus con capas múltiples mayor a 4, compactas y con citoplasma homogéneo y transparente.

Tipo B: capas múltiples de cumulus de 1 a 3 con citoplasma homogéneo y zonas periféricas oscuras.

Tipo C: cumulus desnudado con citoplasma irregular con zonas oscuras.

- Una vez encontrados los ovocitos de tipo A (inmaduros) se procedió a lavar en diversas gotas de holding colocadas en una caja petri diferente hasta que estén completamente limpios.
- En otra caja petri se colocó 3 o 4 gotas grandes de etilenglicol para proceder con el llenado de la pajilla de 0.25 en el extremo del algodón. En el proceso de llenado se absorbió un segmento de etilenglicol o polietilenglicol (respectivamente), se dejó un espacio de aire, se absorbió los ovocitos, se dejó un espacio de aire y otro segmento de etilenglicol o polietilenglicol (respectivamente) para posteriormente sellar la pajilla con un tapón de embriones, pvc o bolitas.
- Luego se encendió la crioconservadora, se llenó de nitrógeno líquido y se ubicó en la curva 3 de congelación lenta la misma que debe marcar -6 que es la temperatura óptima para colocar las pajillas previamente llenas y se esperó 5 minutos y empieza la curva, la misma que se demoró de 1 a 2 horas.
- Luego se realizó el empaquetado que consiste en introducir ovocitos en la pajilla con la misma técnica para embriones, es decir, suspendidos en un medio de congelación separado por 2 burbujas de aire en ambos extremos de la pajilla.
- Después de este transcurso de tiempo se pudo sacar las pajillas desde -23°C a -33°C para luego ser colocada en un termo de nitrógeno líquido.

## **POST DESCONGELACIÓN**

El protocolo a seguir para llevar a cabo la descongelación fue el siguiente:

- Abrir el termo de nitrógeno líquido donde se encuentran las pajuelas.

- Sacar con cuidado la canastilla sin sobrepasar la boca del termo de nitrógeno líquido.
- Rápidamente con una pinza se extrae la pajueta.
- Descongelar en agua a 37°C durante 45 segundos.
- Corta el extremo de la pajueta donde se encuentra el tapón.
- Sacudir con movimientos leves.
- Colocar el material en una caja Petri.
- Observar al estereomicroscopio para verificar la calidad y la viabilidad de los ovocitos descongelados.

## CAPÍTULO III

### 3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente capítulo se detallan los resultados obtenidos en el proceso de experimentación, los análisis estadísticos y las representaciones gráficas de las variables: técnicas de obtención de ovocitos, crioprotectores, número de ovocitos y calidad de ovocitos pre y post crioconservación.

#### 3.1. Técnicas de obtención de ovocitos

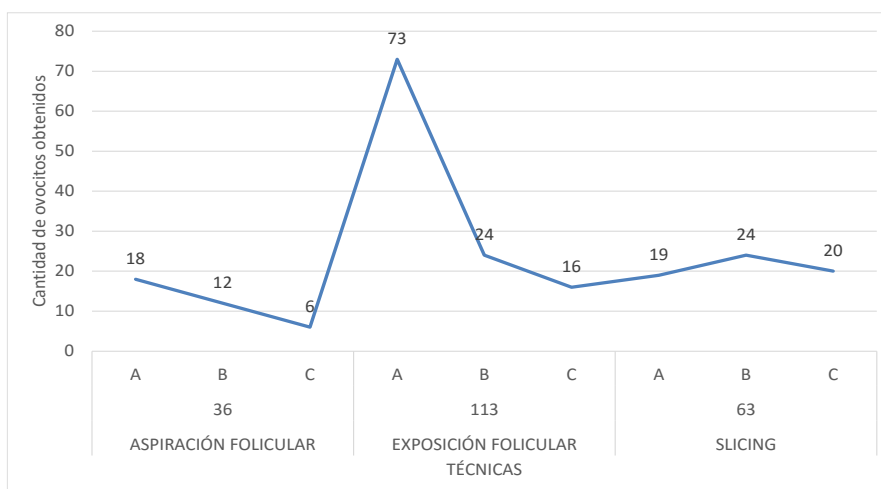
**CUADRO N° 6 NÚMERO OVOCITOS RECOLECTADOS Y CATEGORIZADOS POR TÉCNICA Y CALIDAD**

N° PRACTICA	N° OVARIOS	TÉCNICA	N° OVOCITOS	CALIDAD	Cantidad de ovocitos obtenidos
					Recuento
1	12	ASPIRACIÓN FOLICULAR	36	A	18
				B	12
				C	6
2	12	EXPOSICIÓN FOLICULAR	113	A	73
				B	24
				C	16
3	12	SLICING	63	A	19
				B	24
				C	20

Fuente: Directa

Elaborado por: Juan Paredes Alarcón

**GRÁFICO N° 1. NÚMERO OVOCITOS RECOLECTADOS Y CATEGORIZADOS POR TÉCNICA Y CALIDAD.**



**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Juan Paredes Alarcón

En el cuadro N° 6 y gráfico N° 1 se puede observar la cantidad y calidad de ovocitos conseguidos con cada una de las técnicas propuestas, se obtuvieron un total de 212 ovocitos: 36 ovocitos para aspiración folicular, de los cuales 18 ovocitos son de calidad A, 12 ovocitos calidad B y 6 ovocitos calidad C. 113 ovocitos para exposición folicular, de los cuales 73 ovocitos son de calidad A, 24 ovocitos calidad B y 16 ovocitos calidad C. 63 ovocitos para slicing de los cuales 19 ovocitos son de calidad A, 24 ovocitos calidad B y 20 ovocitos calidad C.

**3.2. Técnicas y Crioprotectores pre congelación.**

**CUADRO N° 7. CANTIDAD Y CALIDAD DE OVOCITOS PRE CONGELACIÓN, SEGÚN TÉCNICA Y CRIOPROTECTOR.**

TÉCNICAS	CRIOPROTECTORES	CALIDAD	CANTIDAD
ASPIRACIÓN FOLICULAR	ETILENGLICOL	A	9
ASPIRACIÓN FOLICULAR	POLIETILENGLICOL	A	9
SLICING	ETILENGLICOL	A	9
SLICING	POLIETILENGLICOL	A	9
EXPOSICIÓN FOLICULAR	ETILENGLICOL	A	36
EXPOSICIÓN FOLICULAR	POLIETILENGLICOL	A	36

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Juan Paredes Alarcón

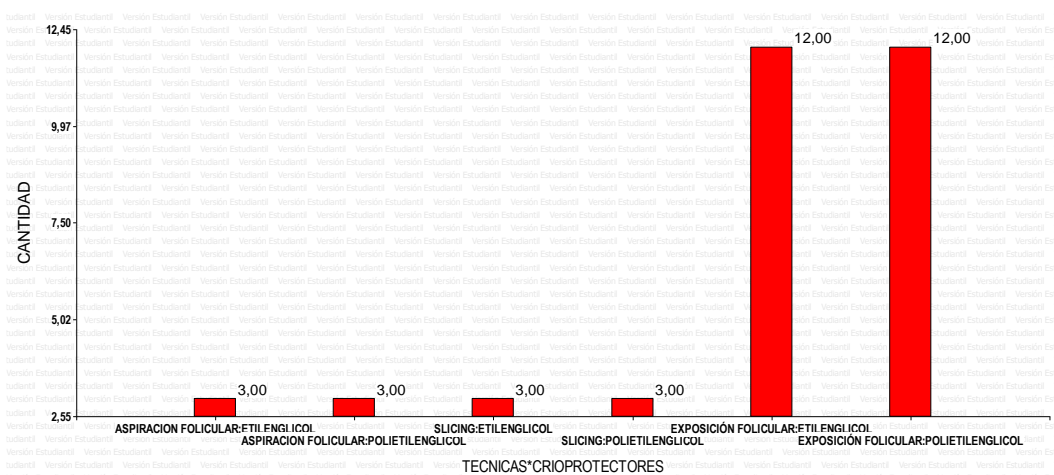
## CUADRO N° 8. ANÁLISIS DE LA VARIANZA TÉCNICAS Y CRIOPROTECTORES PRE CONGELACIÓN

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
<b>Modelo.</b>	324,00	5	64,80	38,88	<0,0001
<b>A (TÉCNICAS)</b>	324,00	2	162,00	97,20	<0,0001
<b>B (CRIOPROTECTORES)</b>	0,00	1	0,00	0,00	>0,9999
<b>A*B (TÉCNICAS*CRIOPROTECTORES)</b>	0,00	2	0,00	0,00	>0,9999
<b>Error</b>	20,00	12	1,67		
<b>Total</b>	344,00	17			

Fuente: Directa

Elaborado por: Juan Paredes Alarcón

## GRÁFICO N° 2. CANTIDAD Y CALIDAD DE OVOCITOS PRE CONGELACIÓN, SEGÚN TÉCNICA Y CRIOPROTECTOR



Fuente: Directa

Elaborado por: Juan Paredes Alarcón

En el cuadro N° 7 y cuadro N° 8 y gráfico N° 2 se puede observar la cantidad ovocitos calidad A conseguidos con cada una de las técnicas propuestas, destinados a la experimentación con los crioprotectores y posteriormente a ser congelados, se distribuyeron: 18 ovocitos de calidad A mediante aspiración folicular, 9 ovocitos para etilenglicol y 9 ovocitos para polietilenglicol; 18 ovocitos de calidad A mediante slicing, 9 ovocitos para etilenglicol y 9 ovocitos para polietilenglicol. 72 ovocitos de calidad A mediante exposición folicular, 36 ovocitos para etilenglicol y 36 ovocitos para polietilenglicol. En el análisis de varianza no existieron diferencias significativas en cuanto a la interacción técnicas-crioprotectores, el valor p calculado 0,9999 es superior a 0,05. Lo cual permitió llevar un desarrollo adecuado del experimento.



### 3.3. Técnicas y Crioprotectores post congelación.

**CUADRO N° 9. CANTIDAD Y CALIDAD DE OVOCITOS POST CONGELACIÓN, SEGÚN TÉCNICA Y CRIOPROTECTOR.**

TÉCNICAS	CRIOPROTECTORES	CALIDAD	CANTIDAD
ASPIRACIÓN FOLICULAR	ETILENGLICOL	A	9
ASPIRACIÓN FOLICULAR	POLIETILENGLICOL	A	4
SLICING	ETILENGLICOL	A	9
SLICING	POLIETILENGLICOL	A	4
EXPOSICIÓN FOLICULAR	ETILENGLICOL	A	36
EXPOSICIÓN FOLICULAR	POLIETILENGLICOL	A	25

Fuente: Directa

Elaborado por: Juan Paredes Alarcón

**CUADRO N° 10. ANÁLISIS DE LA VARIANZA TÉCNICAS Y CRIOPROTECTORES POST CONGELACIÓN**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	284,50	5	56,90	37,93	<0,0001
A (TÉCNICAS)	256,00	2	128,00	85,33	<0,0001
B (CRIOPROTECTORES)	24,50	1	24,50	16,33	0,0016
A*B (TÉCNICAS*CRIOPROTECTORES)	4,00	2	2,00	1,33	0,0300
Error	18,00	12	1,50		
Total	302,50	17			

Fuente: Directa

Elaborado por: Juan Paredes Alarcón

**CUADRO N° 11. TEST DUNCAN PARA TÉCNICAS Y CRIOPROTECTORES.**

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 1,5000 gl: 12

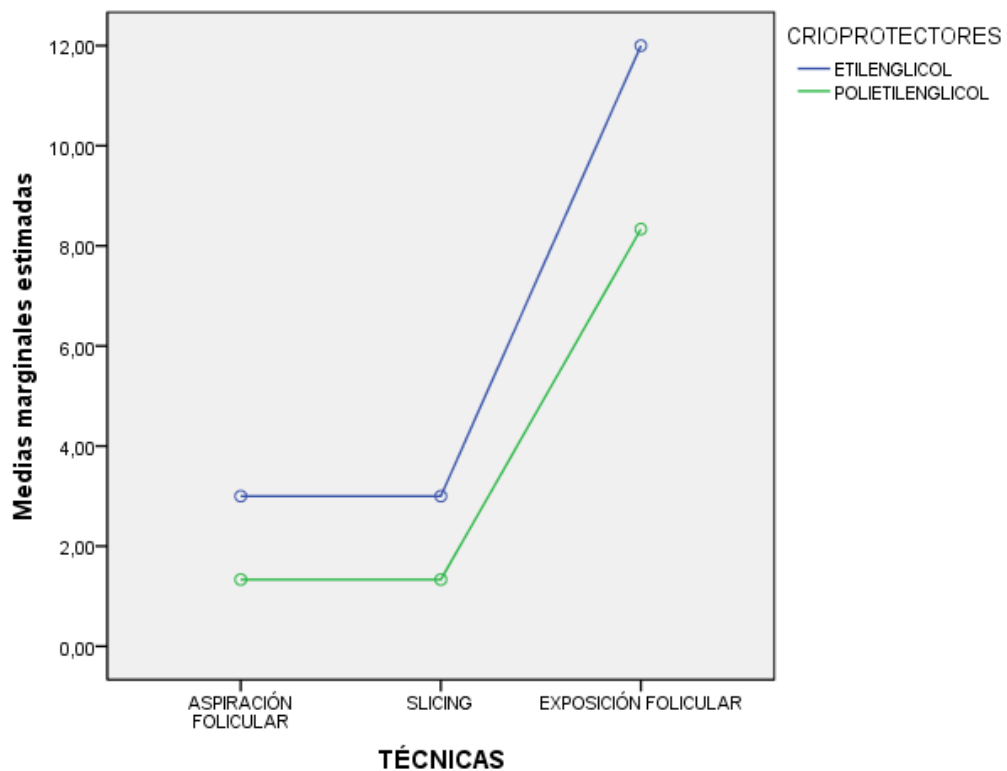
TÉCNICAS	CRIOPROTECTORES	Medias	E.E.			
ASPIRACIÓN FOLICULAR	POLIETILENGLICOL	1,33	0,71	A		
SLICING	POLIETILENGLICOL	1,33	0,71	A		
ASPIRACIÓN FOLICULAR	ETILENGLICOL	3,00	0,71	A		
SLICING	ETILENGLICOL	3,00	0,71	A		
EXPOSICIÓN FOLICULAR	POLIETILENGLICOL	8,33	0,71		B	
EXPOSICIÓN FOLICULAR	ETILENGLICOL	12,00	0,71			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Fuente: Directa

Elaborado por: Juan Paredes Alarcón

**GRÁFICO N° 3. CANTIDAD Y CALIDAD DE OVOCITOS POST CONGELACIÓN, SEGÚN TÉCNICA Y CRIOPROTECTOR.**



**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Juan Paredes Alarcón

Luego de descongelados los ovocitos se pudo evidenciar en el cuadro N° 9, la siguiente distribución: los ovocitos producto de la técnica de aspiración folicular tratados con etilenglicol mantuvieron sus características en su totalidad (pre = 9, post = 9), mientras que los ovocitos producto de la misma técnica tratados con polietilenglicol perdieron sus características de viabilidad (pre = 9 post = 4). Los ovocitos producto de la técnica slicing tratados con etilenglicol mantuvieron sus características en su totalidad (pre = 9, post = 9), mientras que los ovocitos producto de la misma técnica tratados con polietilenglicol perdieron sus características de viabilidad (pre = 9, post = 4). Los ovocitos producto de la técnica de exposición folicular tratados con etilenglicol mantuvieron sus características en su totalidad (pre = 36, post = 36) mientras que los ovocitos producto de la misma técnica tratados con polietilenglicol perdieron sus características de viabilidad (pre = 36, post = 25).

En el cuadro N° 10 en cuanto al análisis de varianza existen diferencias significativas entre los tratamientos (técnicas y crioprotectores) ( $p$ -valor  $< 0.0300$ ), por lo que se realizó la prueba de rango múltiple de DUNCAN, en el cuadro N° 11, determinando que el tratamiento exposición folicular más el crioprotector etilenglicol (12,00 ovocitos) es mejor en calidad y cantidad, que los tratamientos exposición folicular-polietilenglicol (8.33 ovocitos); slicing-etilenglicol (3.00 ovocitos); aspiración folicular-etilenglicol (3.00 ovocitos); slicing-polietilenglicol (1,33 ovocitos) y aspiración folicular-polietilenglicol (1.33 ovocitos).

En el gráfico N° 3 se puede observar la cantidad media de ovocitos calidad A conseguidos luego de la aplicación de los tratamientos post congelación, haciéndose evidente la trayectoria superior en cuanto a los tratamientos en los cuales se aplicó el crioprotector etilenglicol.

## CONCLUSIONES

En esta investigación se logró evaluar tres técnicas de extracción de ovocitos (aspiración folicular, slicing, exposición folicular) junto a los dos crioprotectores (etilenglicol y polietilenglicol) en conejas *post-mortem*, donde se puede concluir:

- Luego de realizar las prácticas basadas principalmente en el conteo de ovocitos obtenidos y la observación de membranas con microscopio; resulta evidente la eficacia de la técnica denominada exposición folicular sobre las otras técnicas ensayadas, tanto por la mayor cantidad de ovocitos obtenidos, como en la calidad de los mismos.
- Se practicó la evaluación post criopreservación de 108 ovocitos en la cual, el etilenglicol mantuvo la calidad de los ovocitos a él expuestos (54 ovocitos de 54 ovocitos), mientras que los ovocitos tratados con el crioprotector polietilenglicol, sufrieron cambios en sus estructuras viéndose disminuida su calidad y determinándolos así no viables (34 ovocitos de 54 ovocitos).
- Basándonos en los resultados obtenidos el protocolo recomendable para la obtención de ovocitos y posterior criopreservación, es la técnica de exposición folicular más etilenglicol, por dar mejores resultados en cuanto a cantidad y calidad de los ovocitos recuperados.
- Se identificó un total de 212 ovocitos, categorizados según la técnica por la cual fueron obtenidos y calidad: aspiración folicular 36, de los cuales, 18 calidad A, 12 calidad B, 6 calidad C; slicing 63, de los cuales, 19 calidad A,

24 calidad B, 20 calidad C; exposición folicular 113, de los cuales, 73 calidad A, 24 calidad B, 16 calidad C.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda en trabajos posteriores realizar estudios similares en otras especies animales y comparar su eficiencia.
- Utilizar la técnica de exposición folicular además del crioprotector etilenglicol como protocolo para obtención de ovocitos, ya que ha demostrado una mayor recuperación y mejor crioconservación del material genético.
- Realizar trabajos experimentales de obtención de ovocitos evaluando la técnica de exposición folicular con otros crioprotectores.
- Para obtener un porcentaje elevado de ovocitos tipo A se recomienda la inoculación de hormona GnRh sintética, 12 horas antes de faenar a los animales.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Albarracín, M. (2005). *Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica open pulled straw*. Bellaterra, España: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Albarrán, G. E., & Calderón, R. (2007). *Inseminación artificial y Andrología Veterinaria. Tomo I*. La Habana, Cuba: Félix Varela.
- Alvariño, J. M., & Ubilla, E. (2003). *Fisiología de la reproducción en la hembra*. España: Ediciones mundiprensa.
- Arthur, G. H., Noakes, D. E., & Pearson. (2003). *Reproducción y obstetricia en veterinaria*. Editorial Interamericana. McGraw-hill.
- Azada, D. (2000). *Criopreservación de ovocitos y fertilización in vitro en bovinos* (Primera ed.).
- Barbado, J. L. (2006). *Cría de conejos*. Buenos Aires, Argentina: Albaratos.
- Bracket, G. B., & Siedel, S. M. (2005). *Avances en zootecnia. Nuevas técnicas de reproducción en conejos*. Zaragoza, España: Acribia.
- Cabodevila, J., & Teruel, M. (2001). *Criopreservación de embriones bovinos*. En: *Bioteología de la reproducción*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología INTA.
- Cabrera, P., & Fernández, A. (2006). Criopreservación de Embriones: una herramienta básica en la Reproducción Asistida. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinaria Central de Venezuela 2009*, 85-90.
- Cervera, C., & Pacual, J. J. (2006). *Manejo de la alimentación de las conejas reproductoras*. Lorca, España: XXXI Symposium de Cunicultura de la Asociación Española de Cunicultura.
- Cole, H. H., & Cup, P. T. (2006). *Reproducción de los animales domésticos* (Tercera ed.). Zaragoza, España: Acribia.

- Cooper, G. W., & Bedford, J. M. (2001). *Cambio de densidad de carga en la superficie vitelino tras la fertilización del huevo del conejo*.
- Córdova, A., Peláez, J., Domínguez, J., Peña, F., & Alegre, B. (2001). *Posibilidades Futuras del Uso de Semen Congelado* (Vol. III). Visión Técnica.
- Fernández, A. M. (2000). *Instrumentos de laboratorio*. E.U.I.T.
- Franco, F., & Gadella, M. (Febrero de 2000). Manual de crianza de conejos. *Publicación Técnica FMV(13)*.
- García García, R. M., Arias Álvarez, M., García Palencia, P., Revuelta, L., Sánchez Maldonado, B., Rebollar, P. G., & Lorenzo, P. L. (2007). Localización del receptor de prolactina en el ovario de conejas en diferentes estado fisiológicos. *XXXII Symposium de ASESCU. Jornadas Ibéricas sobre cunicultura* (págs. 41-44). Vila REal: Boletín de Cunicultura.
- Gutiérrez Carretero, E., Bello Puentes, R., Borrego Dominguez, J. M., Hernández Fernández, A., Muñoz García, J., Prieto González, M. F., & Ordóñez Fernández, A. (Septiembre de 2000). Criopreservación cardíaca a temperatura subcero: estudio de la función sistólica y diastólica. *Revista española de cardiología*, 53(09), 1189-1194.
- Hafez, E. S. (2002). *Preservación y criopreservación de gametos y embriones*. VI Cong. *Reprod. Insem. Artif.* Paris.
- Hasler, J. F. (2002). *The freezing, Thawing, and Transfer of Cattle Embryos. Factors Affecting Calf Crop*. *Biotechnology of Reproduction*. Estados Unidos: CRC.
- Hernandez, A. (2006). *Fisiología de los animales* (Segunda ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana Madrid-España.
- Jainudeen, M. R., Delaveau, Wahid, H., & Hafez, E. S. (2002). Inducción de ovulación, producción y transferencia de embriones. En *Reproducción e inseminación artificial en animales* (págs. 434-435). México, México: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Laing, J. A., W. J., B. M., & W. C., W. (2006). *Fertilidad e Infertilidad en la Práctica Veterinaria* (Cuarta ed.). Madrid, España: McGraw -Hill Interamericana de España.



- Lim, P. (2001). *Fertilización in vitro en bovinos y biotecnología de la Reproducción Animal*.
- M. Kahn, C., B., A., & M., A. (2007). *Manual Merck de Veterinaria* (Sexta ed.). Barcelona, España: Océano/centrum.
- Martínez Acurio, L. A. (2012). Valoración de los indicadores productivos en pollos broilers alimentados con tres niveles de zeolita en Quevedo – Los Ríos. 31-32. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
- Murillo, J. (24 de 11 de 2010). MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN DE ENFOQUE EXPERIMENTAL.
- Nusslag. (2006). *Anatomía y Fisiología de los animales domésticos* (Septima ed.). Zaragoza, España.
- Palma, G. (2003). *Biotecnología de la reproducción*. Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Ramón, J., Rabel, O., & Piles, M. (2004). Resultados de gestión en España GTE 2002. *XXIX Simposio de cunicultura ASESCU*, (págs. 29-32). Lugo.
- Rebollar, P. G. (2000). El aparato reproductor de la coneja y su ciclo hormonal. Sincronización y bioestimulación. *Jornadas Profesionales de Cunicultura de la Real Escuela de Sitges*, (págs. 15-18). Sitges.
- Rebollar, P. G. (2002). *Inseminación artificial. Control de la reproducción en cunicultura*. Madrid, España.
- Rebollar, P. G., Lorenzo, P. L., Carneiro, G. F., & Liu I., K. M. (2001). *Estudios preliminares sobre la migración de gránulos corticales en oocitos de conejas sometidas a distintos métodos de sincronización de celo*. México, México: ITEA.
- Roa, N. A., Linares, T., & Tamasaukas, R. (2003). Métodos y aplicaciones de la criopreservación de oocitos y embriones en bovinos y otros mamíferos. Una revisión. *Revista Científica*, VIII(1), 40-52.
- Roca, T. G., Hill & White, Viudes de Castro, M. P., & Vicente, J. S. (Enero - Diciembre de 2009). Inseminación Artificial en conejos. *Revista Freagas*(35), 28-35.

Rojas Cairampoma, M. (2015). Tipos de Investigación científica: Una simplificación de la complicada incoherente nomenclatura y clasificación. *Revista electrónica de Veterinaria*, 16(1). Recuperado el 29 de Abril de 2015, de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010115.html>

Ruiz, J., & Correa, J. (2007). *Desarrollo partenogénico in vitro con ovocitos vitrificados bovinos. Biotecnología de la reproducción*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA.

Shively, M. J. (2008). *Anatomía Veterinaria Básica, comparativa y clínica. Manual Moderno* (Sexta ed.). Estados Unidos.

World Health Organization. (2005). *Manual de bioseguridad en el laboratorio* (Tercera ed.).

## **ANEXOS**

### ANEXO N° 1. OVOCITOS RECUPERADOS

N° PRACTICA	N° CONEJA	N° OVARIOS	TÉCNICA	N° OVOCITOS	CALIDAD		
					A	B	C
1	1	1	ASPIRACIÓN FOLICULAR	36	2	2	0
		2	ASPIRACIÓN FOLICULAR		2	1	0
	2	3	ASPIRACIÓN FOLICULAR		0	1	1
		4	ASPIRACIÓN FOLICULAR		2	0	0
	3	5	ASPIRACIÓN FOLICULAR		1	0	1
		6	ASPIRACIÓN FOLICULAR		3	0	0
	4	7	ASPIRACIÓN FOLICULAR		2	3	0
		8	ASPIRACIÓN FOLICULAR		0	2	0
	5	9	ASPIRACIÓN FOLICULAR		2	0	2
		10	ASPIRACIÓN FOLICULAR		0	1	0
	6	11	ASPIRACIÓN FOLICULAR		1	1	2
		12	ASPIRACIÓN FOLICULAR		3	1	0
2	7	13	EXPOSICIÓN FOLICULAR	113	7	2	3
		14	EXPOSICIÓN FOLICULAR		6	4	0
	8	15	EXPOSICIÓN FOLICULAR		6	0	4
		16	EXPOSICIÓN FOLICULAR		5	0	2
	9	17	EXPOSICIÓN FOLICULAR		6	0	1
		18	EXPOSICIÓN FOLICULAR		9	1	1
	10	19	EXPOSICIÓN FOLICULAR		7	4	0
		20	EXPOSICIÓN FOLICULAR		5	4	0
	11	21	EXPOSICIÓN FOLICULAR		7	1	1
		22	EXPOSICIÓN FOLICULAR		3	3	1
	12	23	EXPOSICIÓN FOLICULAR		7	0	0
		24	EXPOSICIÓN FOLICULAR		5	5	3
3	13	25	SLICING	63	3	2	3
		26	SLICING		2	1	3
	14	27	SLICING		2	4	0
		28	SLICING		4	2	2
	15	29	SLICING		0	2	1
		30	SLICING		0	0	4
	16	31	SLICING		2	4	0
		32	SLICING		1	3	3
	17	33	SLICING		3	3	0
		34	SLICING		1	1	3
	18	35	SLICING		1	1	1
		36	SLICING		0	1	0
<b>TOTAL</b>				<b>212</b>	<b>110</b>	<b>60</b>	<b>42</b>

Fuente: directa

Elaborado por: Juan Paredes Alarcón

## ANEXO N° 2. OVOCITOS PARA CRIOCONSERVAR

N° PRACTICA	TÉCNICA	CALIDAD			APTOS PARA CRIOCONSERVAR
		A	B	C	
1	ASPIRACIÓN FOLICULAR	18	12	6	18
2	EXPOSICIÓN FOLICULAR	73	24	16	73
3	SLICING	19	24	20	19
<b>TOTAL</b>		<b>110</b>	<b>60</b>	<b>42</b>	<b>110</b>

Fuente: directa

Elaborado por: Juan Paredes Alarcón

**ANEXO N° 3. OVOCITOS POST CRIOCONSERVACIÓN.**

<b>Técnica</b>	<b>Crioprotector</b>	<b>Calidad</b>	<b>Total pre-conservación</b>	<b>Total post-conservación</b>
Aspiración Folicular	Etilenglicol	A	9	9
Aspiración Folicular	Polietilenglicol	A	9	5
Slicing	Etilenglicol	A	9	9
Slicing	Polietilenglicol	A	9	4
Exposición Folicular	Etilenglicol	A	36	36
Exposición Folicular	Polietilenglicol	A	36	25

**Fuente:** directa

**Elaborado por:** Juan Paredes Alarcón



**ANEXO N° 4. OVARIOS EXTRAÍDOS COLOCADOS EN CLORURO DE SODIO AL 0,9%**



**ANEXO N° 5. MÉTODO DE SLICING**





**ANEXO N° 6 LAVADO CON SOLUCIÓN HOLDING**



**ANEXO N° 7 OBSERVACIÓN EN EL ESTEREOMICROSCOPIO DE OVOCITOS OBTENIDOS**



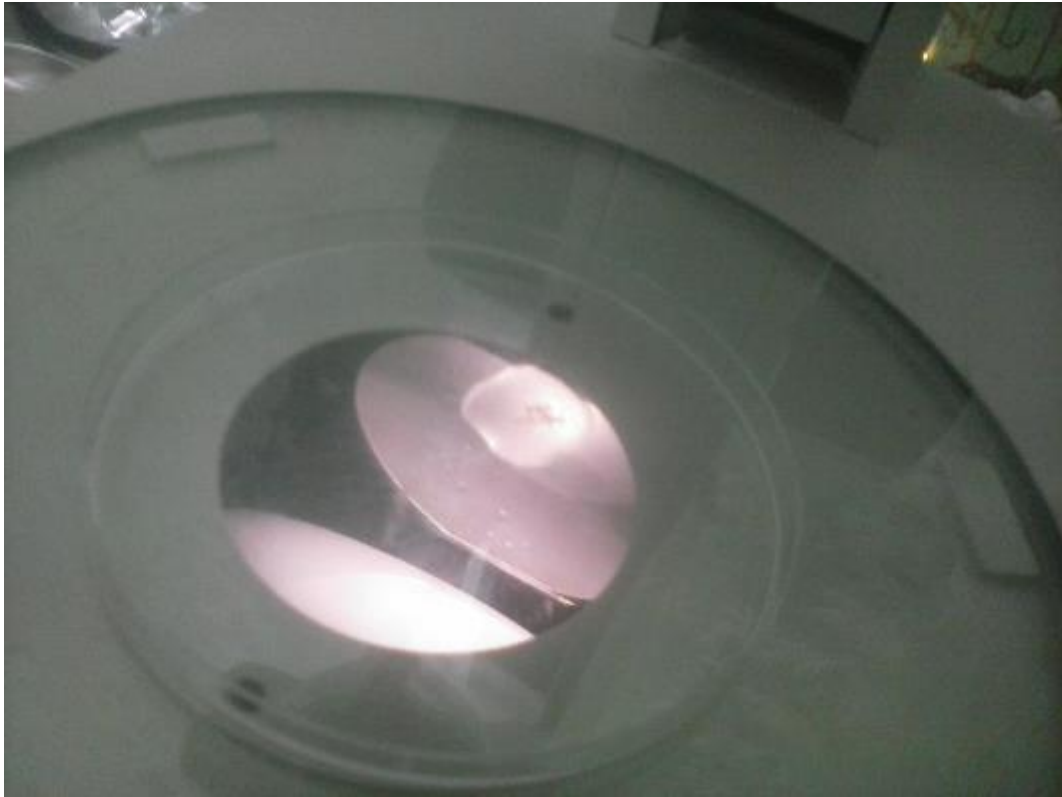
**ANEXO N° 8. TÉCNICA DE ASPIRACIÓN FOLICULAR**



**ANEXO N° 9. DEPÓSITO DE MATERIAL GENÉTICO ASPIRADO EN CAJA PETRI**



**ANEXO N° 10. OBSERVACIÓN EN EL ESTEREOMICROSCOPIO**



**ANEXO N° 11. TÉCNICA DE EXPOSICIÓN FOLICULAR**



**ANEXO N° 12. DEPÓSITO DE FOLÍCULO EN CAJA PETRI**



**ANEXO N° 13. LIBERACIÓN DE OVOCITO DEL FOLÍCULO CON LA AYUDA DE BISEL DE JERINGUILLAS**

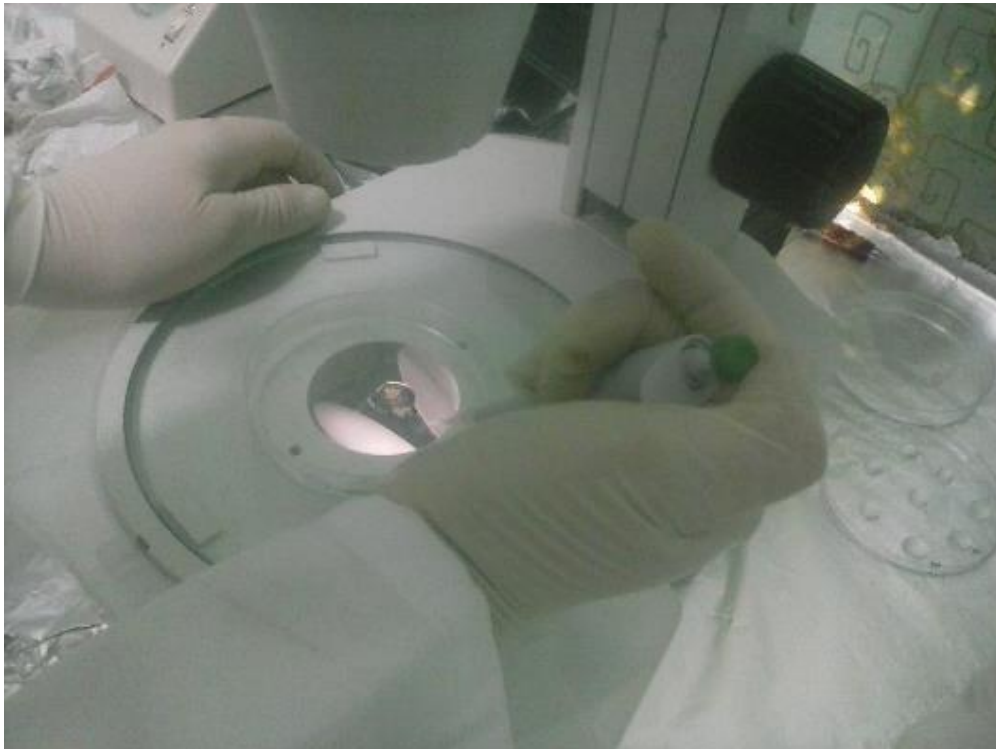




**ANEXO N° 14. LIBERACIÓN DE OVOCITO DEL FOLÍCULO  
(ESTEREOMICROSOPIO)**



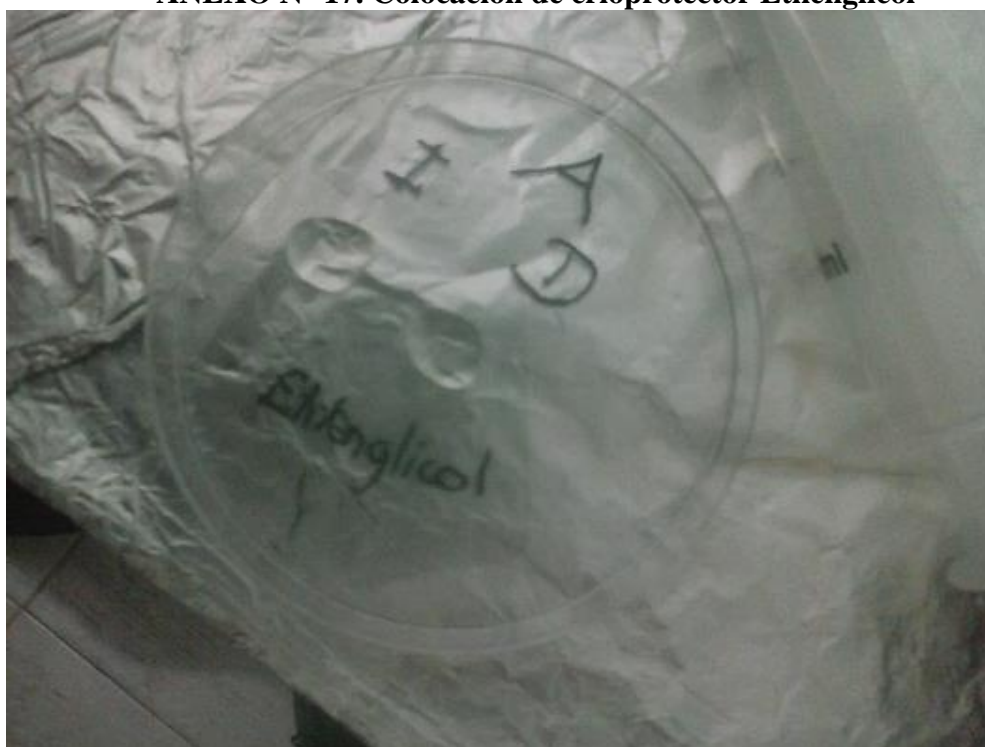
**ANEXO N° 15. RECOLECCIÓN DE OVOCITOS**



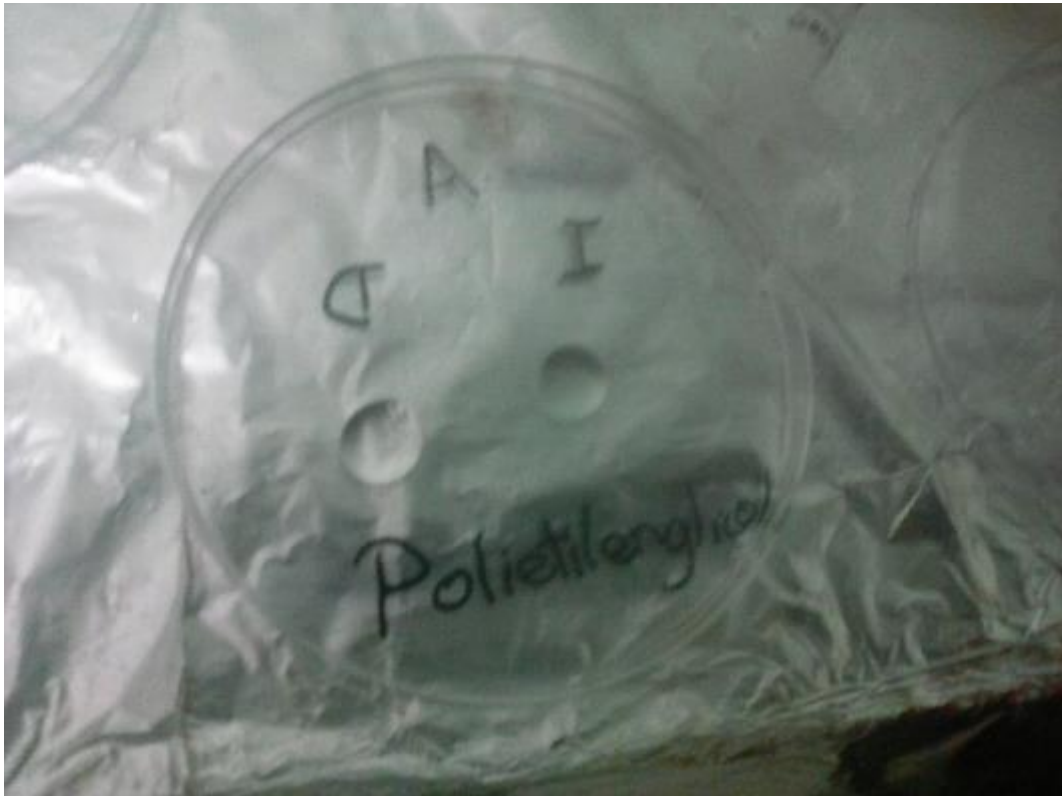
**ANEXO N° 16. CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y POLIETILENGLICOL)**



**ANEXO N° 17. Colocación de crioprotector Etilenglicol**



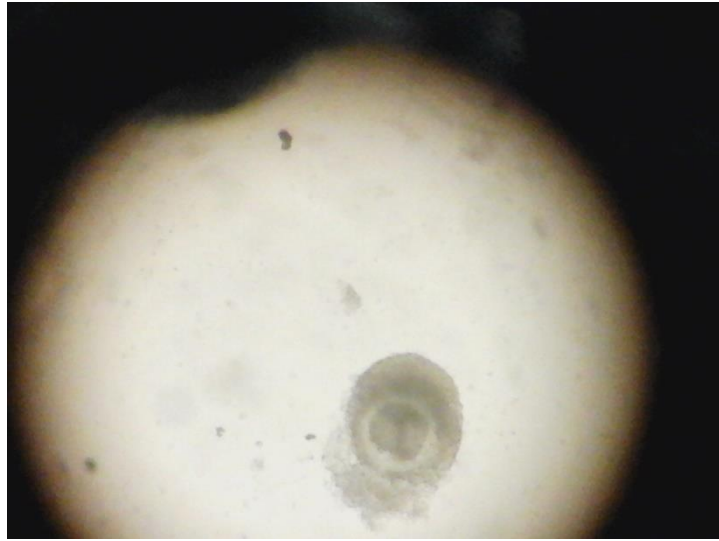
**ANEXO N° 18. COLOCACIÓN DE CRIOPROTECTOR  
POLIETILENLICOL**



**ANEXO N° 19. COLOCACIÓN DE PAJILLAS EN LA  
CRIOCONSERVADORA**



**ANEXO N° 20. OVOCITO TIPO A**



**ANEXO N° 21. OVOCITO TIPO A**

