

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES.



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TEMA: “EVALUACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA EXTRACCIÓN DE OVOCITOS (ASPIRACIÓN FOLICULAR, SLICING, EXPOSICIÓN FOLICULAR) CON DOS CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y POLIETILENGLICOL) EN OVEJAS (OVIS ARIES) DE MATADERO EN EL CEASA”

TESIS DE GRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

AUTOR

Edgar Miguel Romero Proaño.

DIRECTORA DE TESIS

M.V.Z. Paola Jael Lascano Armas

LATACUNGA – ECUADOR

2015.

AUTORÍA

Yo Edgar Miguel Romero Proaño 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

Romero Proaño Edgar Miguel.

C.I. 180388414-5

AUTOR.

AVAL DE APROBACIÓN

DIRECTOR DE TESIS.

En calidad de Director de Tesis Titulada: **“EVALUACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA EXTRACCIÓN DE OVOCITOS (ASPIRACIÓN FOLICULAR, SLICING, EXPOSICIÓN FOLICULAR) CON DOS CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y POLIETILENGLICOL) EN OVEJAS (OVIS ARIES) DE MATADERO EN EL CEASA”**.

Propuesto por el alumno Edgar Miguel Romero Proaño, 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.

Atentamente:

Dra. 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 con el tema de tesis **“EVALUACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA EXTRACCIÓN DE OVOCITOS (ASPIRACIÓN FOLICULAR, SLICING, EXPOSICIÓN FOLICULAR) CON DOS CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y POLIETILENGLICOL) EN OVEJAS (OVIS ARIES) 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.

Aprobado por:

Dr. Rafael Alfonso Garzón Jarrín.Msc.
Presidente del tribunal

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

Dra. Blanca Janeth Villavicencio Villavicencio.Mg.
Opositor.

AGRADECIMIENTO

A Dios sobre todas las cosas por la fortaleza y la sabiduría que puso en mí a cada instante para poder superar todo obstáculo que se me presento en el camino y seguir adelante hasta alcanzar mi meta anhelada.

A mis padres por su apoyo incondicional y por el amor e interés demostrados en todos los momentos que conformaron mi vida estudiantil.

A mi esposa por su apoyo y amor para poder culminar una meta más en mi vida.

A mi hija por ser la razón de mi sacrificio para lograr culminar mis objetivos.

Edgar Miguel Romero Proaño

DEDICATORIA

A Dios, verdadera fuente de amor y sabiduría.

A mi padre porque gracias a él sé que la responsabilidad se la debe vivir como un compromiso de dedicación y esfuerzo.

A mi madre, cuyo vivir me ha mostrado que en el camino hacia la meta se necesita de la dulce fortaleza para aceptar las derrotas y del sutil coraje para derribar miedos.

A mi esposa e hija por el amor incondicional que me motiva y recuerda que detrás de cada detalle existe el suficiente alivio para empezar nuevas búsquedas.

Edgar Miguel Romero Proaño

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”

Edgar Miguel Romero Proaño.

ÍNDICE DE CONTENIDOS.

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
ÍNDICE DE CONTENIDOS.	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XII
RESUMÉN.	XIII
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	1
OBJETIVO GENERAL.....	1
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	1
HIPÓTESIS.....	2
HIPÓTESIS ALTERNATIVA.	2
HIPÓTESIS NULA.	2
CAPÍTULO I	3
REVISIÓN LITERARIA.....	3
1.1. Ovinos.....	3
1.2. Anatomía del aparato reproductivo de la hembra.	3
1.2.1. EL CICLO SEXUAL DE LA OVEJA.....	6
Fase Folicular.....	6
Fase Lútea.....	6
1.3. Aspectos fisiológicos de la reproducción.....	7
1.4. Fisiología de la Fecundación.....	8
1.4.1. Ovogénesis.....	8
1.4.2. Crecimiento folicular.	10

1.4.2.1.	Folículo primordial.	11
1.4.2.2.	Folículo primario.....	11
1.4.2.3.	Folículo secundario o preantral.....	12
1.4.2.4.	Folículo terciario o antral.....	13
1.4.2.5.	Folículo preovulatorio o de Graff.	13
1.4.3.	Maduración del óvulo.	14
1.5.	OVOCITO.....	14
1.5.1.	Estructura del ovocito	15
1.5.1.1.	Zona pelúcida.....	15
1.5.1.2.	Membrana plasmática.	16
1.5.1.3.	Pronúcleo ovular.	16
1.5.1.4.	Gránulos corticales.....	16
1.5.1.5.	Espacio perivitelino.....	16
1.5.2.	Clasificación de los ovocitos.....	17
1.6.	ESTADO MADURATIVO DE LOS OVOCITOS.....	18
1.7.	MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE OVOCITOS.....	19
1.7.1.	Aspiración de líquido folicular.....	19
1.7.2.	Corte de ovarios (Slicing)	20
1.7.3.	Método de exposición folicular.....	20
1.8.	CRIOPROTECTORES	20
1.8.1.	Crioprotectores permeables.....	22
1.8.1.1.	Etilenglicol.....	22
1.8.2.	Crioprotectores no permeables.....	22
1.8.2.1.	Polietilenglicol	23
CAPÍTULO II.....		24
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.	24
2.1	Ubicación de la Investigación.	24
Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.....		
2.1.2	Condición geográfica	24
2.1.1.1.	Ubicación Política.....	24
2.1.2.	Ubicación Geográfica	25
2.1.3.	Datos meteorológicos.....	25
2.2.1	Materiales de oficina.....	25

2.2.2	Recursos tecnológicos.....	26
2.2.3	Materiales de laboratorio.	26
2.2.4	Material biológico.....	27
2.2.5	Animales	27
2.3.	Tipo de Investigación.....	27
2.3.1.	Experimental.....	27
2.4.	METODOLOGÍA.....	27
2.4.1.	Métodos.....	28
2.4.2.	Técnicas	29
2.5.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
2.5.1.	TRATAMIENTOS.....	30
2.6.	DESARROLLO DEL ENSAYO.....	31
	POST DESCONGELACIÓN	33
	CAPITULO III.....	34
3.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	34
2.1.	Técnicas de obtención de ovocitos.....	35
	CONCLUSIONES.....	45
	RECOMENDACIONES.....	46
	BIBLIOGRAFÍA.....	47
	ANEXOS.....	50
	Anexo 1.....	51
	Anexo 2.....	51
	Anexo 3.....	52
	Anexo 5.....	53
	Anexo 6.....	53
	Anexo 7.....	54
	Anexo 8.....	54
	Anexo 9.....	55
	Anexo 10.....	55
	Anexos 11.....	56
	Anexos 12.....	59
	Anexos 13.....	59

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Figura 1. Aparato reproductivo de la oveja.....	4
figura 2. Diagrama de la ovogénesis.	9
figura 3. Estructuras del ovocito.....	15
figura 4. Tipos de ovocitos por su calidad.....	18
figura 5. Tratamientos	30

ÍNDICE DE TABLAS

CUADRO NO. 1 ÓRGANOS REPRODUCTORES DE LA HEMBRA	5
CUADRO NO. 2 CRIOPROTECTORES MÁS UTILIZADOS EN REPRODUCCIÓN.	21
CUADRO NO. 3 ESQUEMA DEL ANÁLISIS DE VARIANZA (ADEVA)	30
CUADRO NO. 4 NÚMERO DE OVOCITOS RECOLECTADOS.	35
CUADRO NO. 5 OVOCITOS	37
CUADRO NO. 6 FACTORES INTER-SUJETOS.	39
CUADRO NO. 7 PRUEBAS DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS	41
CUADRO NO. 8 OVOCITOS	41

RESUMÉN.

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Técnica de Cotopaxi desarrollada por la Carrera de Medicina Veterinaria en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción.

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar cuál de las técnicas: slicing, aspiración folicular y exposición folicular, es la más apropiada en la categorización, calidad y rendimiento de ovocitos mediante el empleo de los dos crioprotectores etilenglicol y polietilenglicol.

Para el estudio se recolectaron 36 ovarios de 18 hembras post-mortem, los cuales fueron colocados en un termo con un medio apropiado para su transporte al laboratorio y posteriormente ser extraídos los ovocitos.

La obtención de los ovocitos se realizó mediante tres pasos fundamentales: Extracción, Conservación y Congelamiento.

Utilizando un microscopio, crioconservadora y un termo de nitrógeno líquido, para obtener ovocitos de excelente calidad.

Obteniendo así un resultado de 84 ovocitos de tipo A (excelente calidad), 66 de tipo B (calidad regular) 62 fueron denominados de tipo C (mala calidad), teniendo en cuenta que crioconservaremos solo los de tipo A.

ABSTRACT

This research was carried out at the Technical University of Cotopaxi developed at the Career of Veterinary Medicine at the Laboratory of Reproductive Biotechnology.

The main goal of this study was to evaluate which of the techniques: slicing, absorb and follicular exhibition is the most appropriate in categorizing, oocytes quality and performance by using both ethylene glycol and polyethylene glycol cryo-protectants.

For the investigation study I got 36 ovaries of 18 females samples I have gotten post-mortem, which were placed in a thermos with a suitable means of transport to the laboratory and then they were extracted the oocytes.

To get the oocytes, it was performed using three basic steps: Extraction, Conservation and Freezing.

Using a microscope, cryopreservative and a thermos of liquid nitrogen to obtain excellent quality oocytes.

Getting a result of 84 oocytes type A (excellent quality), Type B 66 (medium quality), type C 62 (poor quality), taking that only cryo-protectants, type A.

WORDS: oocytes, sheep, cryo-protectants, collection techniques, veterinary, reproduction, laboratory.

INTRODUCCIÓN

En nuestro País no se realiza la técnica biotecnológica para la producción in vitro de embriones, por lo que estas técnicas ayudaran en la reproducción asistida y para el mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales.

Esta investigación nos permitirá dar solución a un problema de la biotecnología de la reproducción con el objeto de determinar cómo afectan las técnicas del slicing, aspiración folicular y exposición folicular en la categorización, calidad y rendimiento de ovocitos mediante el empleo de los dos crioprotectores etilenglicol y polietilenglicol recuperados de los ovarios produciendo resultados que serán una base para el desarrollo de futuras investigaciones en la cual se podría tomar como una referencia para seguir en el desarrollo de investigaciones relacionadas con el tema, teniendo en cuenta los aspectos que se darán para cada una de las variables a investigar.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar tres técnicas para extracción de ovocitos (aspiración folicular, slicing, exposición folicular) con dos crioprotectores en ovejas (ovis aries) de matadero mediante microscopia para determinar su validez en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Valorar tres técnicas diferentes de extracción de ovocitos en ovejas post mortem mediante la observación de membranas con microscopia para evidenciar su calidad.

- Determinar la cantidad de ovocitos extraídos mediante tres técnicas diferentes y la utilización de dos crioprotectores etilenglicol y polietilenglicol en ovejas post mortem mediante la cuantificación con microscopia para evidenciar su eficiencia.
- Establecer la calidad de los ovocitos extraídos post crio conservación mediante microscopia para determinar la validez de las técnicas mencionadas.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS ALTERNATIVA.

Hi.- Se logrará identificar la eficiencia entre las tres técnicas de extracción de ovocitos (aspiración folicular slicing, y exposición folicular) con dos crioprotectores (etilenglicol y polietilenglicol) en ovejas (*ovis aries*) de matadero en el CEASA.

HIPÓTESIS NULA.

H0.- No se logrará identificar la eficiencia entre las tres técnicas de extracción de ovocitos (slicing, aspiración folicular y exposición folicular) en ovejas post mortem.

CAPÍTULO I

REVISIÓN LITERARIA.

En el presente capítulo se trata las principales características anatómicas y fisiológicas del aparato reproductor de la oveja y la evaluación de las tres técnicas aplicadas para la extracción de ovocitos.

1.1.Ovinos.

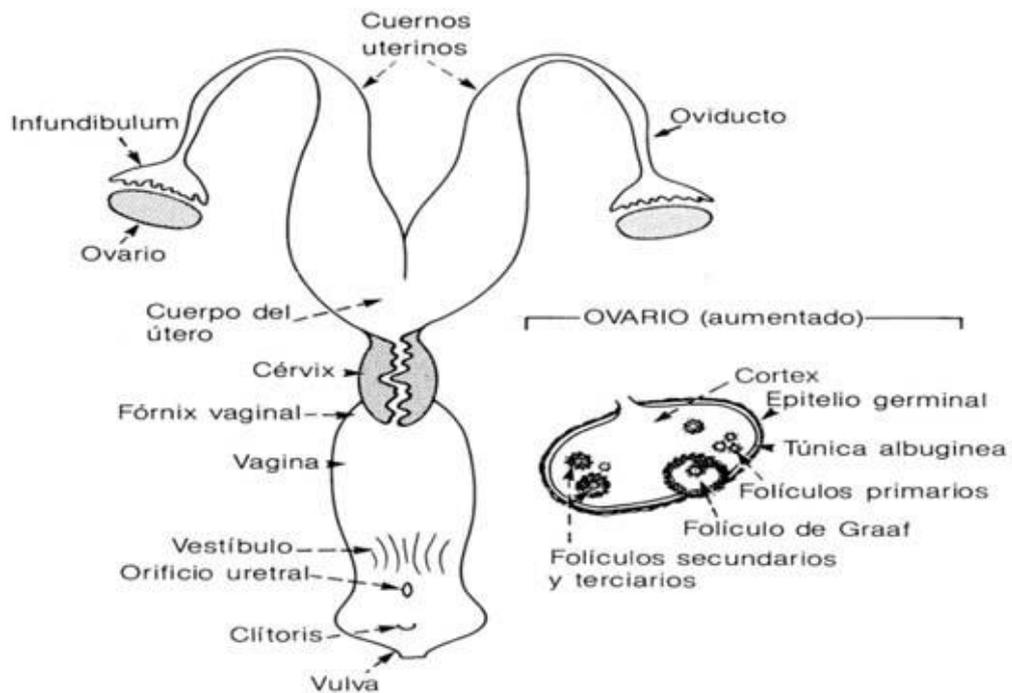
La oveja doméstica (*Ovis orientalis aries* u *Ovis aries*) es un mamífero cuadrúpedo ungulado rumiante doméstico, usado como ganado. Se originó a partir de la domesticación del muflón en Oriente Próximo hacia el IX milenio a. C. con el objetivo de aprovechar su piel, lana, carne y leche. Tiene una longevidad de entre 18 y 20 años, y presenta dimorfismo sexual. (Sánchez, 2000)

1.2.Anatomía del aparato reproductivo de la hembra.

El aparato reproductor de la oveja consta de: 2 ovarios, 2 conductos ováricos o trompas de Falopio, el útero, la vagina y la vulva. No existe demarcación entre la trompa uterina y el cuerno del útero, la trompa es muy flexuosa cerca del infundíbulo. El útero se asemeja al de la vaca, miden entre 10 a 12 cm y se adelgazan en punta de tal manera que su unión con las trompas uterinas se hace insensiblemente, no permitiendo distinguir con claridad el punto de separación entre estos dos órganos, los cuernos son ondulados formando una espiral cerrada.

Los cotiledones son mucho menores que los de la vaca y presentan una depresión en su cara libre. (Alvariño & Ubilla, 2003)

FIGURA 1. APARATO REPRODUCTIVO DE LA OVEJA.



Fuente: GARCÍA, F, FUENTES M., 1958. Manual de crianza de ovinos.

Las ovejas son hembras poliéstricas estacionales (el celo se presenta en una determinada época del año) de días cortos, es decir, solo presentan celo cuando el fotoperiodo es corto o anochece más temprano.

- ✓ Cuando presentan celo, el ciclo dura entre 16 y 17 días en las ovejas más viejas y entre 14 y 16 días en las corderas.
- ✓ Durante los días que está en celo se observan algunas modificaciones en su comportamiento y esto es más evidente delante de machos.
- ✓ El celo puede durar entre 30 y 40 horas. Dependiendo de la edad, raza y presencia de machos.

- ✓ La ovulación por lo común ocurre en las últimas horas del celo y se liberan uno o dos óvulos.
- ✓ Las hembras llegan a la pubertad entre los 5 y los 10 meses pero se recomienda esperar hasta que tengan entre 8 y 14 meses para reproducirlas.
- ✓ Y los machos llegan a la pubertad entre 3 y 6 meses, sin embargo, la edad propicia para la reproducción varía entre los ocho y los 12 meses.
- ✓ La longevidad media está en torno a los 12-14 años. (Sánchez, 2000)

Cuadro No. 1 ÓRGANOS REPRODUCTORES DE LA HEMBRA Y SUS PRINCIPALES FUNCIONES.

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

Fuente: GARCÍA, VALENCIA 2007. Fisiología del aparato reproductor en animales.

1.2.1. EL CICLO SEXUAL DE LA OVEJA.

El ciclo estral comprende dos grandes fases:

Fase Folicular.

Es el período que se extiende entre la luteólisis (ruptura del cuerpo lúteo) y la ovulación. Durante esta fase la estructura ovárica primaria es el folículo preovulatorio, el cual produce gran cantidad de estrógenos y contiene en su interior al óvulo. Esta fase tiene dos períodos, el proestro y el estro. (Laing, W. J., & W. C., 2006)

Proestro.

Dura entre 2 y 5 días dependiendo de la raza. Durante esta fase se desarrollan varios folículos, de los cuales entre 1 y 4 dependiendo de la raza llegarán a ovular.

Estro.

Es el período más fácil de reconocer en la hembra y se caracteriza por el comportamiento que permite el apareamiento, además se observa aumento en la locomoción, inquietud, movimiento de la cola, búsqueda del macho, micciones frecuentes y sobre todo la inmovilidad, cuando es montada por el macho, puede observarse también edematización de la vulva y la presencia de un moco viscoso. El celo dura cerca de 30 hs aunque es muy variable según la raza. Por lo general se considera día 1 del ciclo estral el día de comienzo del estro. La ovulación tiene lugar unas 30 hs después de iniciarse el estro. (Sánchez, 2000)

Fase Lútea.

Se extiende desde la ovulación hasta la luteólisis, la estructura dominante es o son los cuerpos lúteos y la principal hormona producida por ellos es ellos es la Progesterona. La fase lútea presenta dos períodos, el metaestro y el diestro.

Metaestro.

Es corto y se inicia después de la ovulación, cuando el folículo se llena de sangre y se transforma en cuerpo hemorrágico y termina cuando este se transforma en cuerpo lúteo o amarillo.

Diestro.

Es la fase más extensa del ciclo, puede durar 13 días y se caracteriza por la secreción de progesterona. Si la hembra no ha quedado preñada luego de 11 a 12 días el cuerpo lúteo sufre la luteólisis, por acción de la prostaglandina F2 α , sintetizada por el útero y aquí finaliza el diestro. (Cole & Cup, 2006)

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)

1.3. Aspectos fisiológicos de la reproducción.

Múltiples cambios neuroendocrinos están asociadas a este complejo proceso que resultan de la interacción coordinada de varios tejidos: el hipotálamo, la glándula pineal, la glándula pituitaria, el ovario, el útero y la placenta. El sistema nervioso central, por acción de la hormona liberadora de las gonadotropinas hipofisarias (GnRH), estimula en la adenohipófisis la síntesis y secreción de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). Estas gonadotropinas hipofisarias estimulan en las gónadas (ovarios), la esteroidogénesis o síntesis de los esteroides gonadales (estrógenos y progesterona) y junto a ellos participan en el desarrollo de los folículos ováricos y en la ovulación. (Bayer & Rubén., 2010)

En el cerebro de la oveja 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)

Los estímulos locales que se producen a través de receptores localizados en el área genital (flor radiada de los Cérnix) 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)

1.4. Fisiología de la Fecundación.

1.4.1. Ovogénesis.

La ovogénesis es el proceso de formación de los óvulos o gametos femeninos que tiene lugar en los ovarios de las hembras.

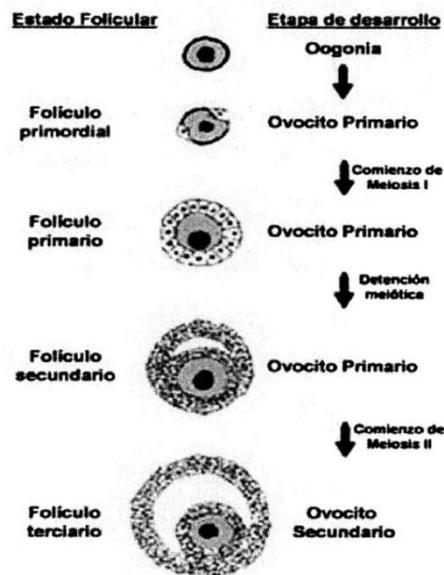
Las células germinales diploides generadas por mitosis, llamadas ovogónias, se localizan en los folículos del ovario, crecen y tienen modificaciones, por lo que reciben el nombre de ovocitos primarios. Éstos llevan a cabo la primera división meiótica, dando origen una célula voluminosa u ovocito secundario que contiene la mayor parte del citoplasma original y otra célula pequeña o primer cuerpo polar. (Vizcarra, 2006)

Estas dos células efectúan la segunda división meiótica; del ovocito secundario se forman otras dos células: una grande, que contiene la mayor parte del citoplasma original, y otra pequeña o segundo cuerpo polar. Los cuerpos polares se

desintegran rápidamente, mientras que la otra célula se desarrolla para convertirse en un óvulo maduro haploide. (Vizcarra, 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 2. DIAGRAMA DE LA OVOGÉNESIS.



FUENTE: Hernandez, A, 2006. Fisiología de los animales.

La ovogénesis es la gametogénesis femenina, es decir, es el desarrollo y diferenciación del gametofito femenino u ovocito mediante una división mitótica. En este proceso a partir de una célula diploide se produce una célula haploide funcional (el ovocito), y tres células haploides no funcionales (los cuerpos polares). En la mayoría de los mamíferos, la ovogénesis comienza durante la vida embrionaria y la transformación de las ovogonias (células diploides) en ovocitos (células haploides) se completa antes del nacimiento. En la oveja, la

ovogénesis se inicia al nacimiento y las ovogonias comienzan la meiosis y se transforman en ovocitos durante los primeros 10 días de vida. (Alvariño & Ubilla, 2003)

Las ovogonias se forman a partir de las células germinales primordiales (CGP). Se originan en el epiblasto a partir de la segunda semana y migran por el intestino primitivo a la zona gonadal indiferenciada alrededor de la quinta semana de gestación. Una vez en el ovario, experimentan mitosis hasta la vigésima semana, momento en el cual el número de ovogonias ha alcanzado un máximo de 7 millones. 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 12a semana de vida. (Hernandez, 2006)

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., 2005).

1.4.2. *Crecimiento folicular.*

El desarrollo folicular se presentan en un patrón de ondas durante el ciclo estral. Una onda folicular es caracterizada por el crecimiento sincrónico de un grupo de folículos, uno (o un número especie-específico) de ellos continúa creciendo (folículo dominante) mientras los otros regresan por inhibición de su desarrollo (folículos subordinados). (Bayer & Rubén., 2010)

La selección folicular es el proceso por el cual se disminuye el número de folículos en crecimiento en una onda de acuerdo al número de folículos especie-específicos que ovulan. Durante el ciclo estral, el folículo dominante y el folículo subordinado mayor alcanzan diámetros máximos de 5-7 y 3-5 mm, respectivamente. En muchos casos los folículos ovulatorios se desarrollan desde

un grupo de folículos desde la última onda folicular 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. (Hernandez, 2006)

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)

1.4.2.1. Folículo primordial.

Está compuesto por un oocito primario rodeado por una sola capa de células foliculares planas con un diámetro total de 15 μm . El oocito primario presenta un oocito detenido en la etapa de profase de la meiosis 1. Es una célula esférica con un gran núcleo desplazado del centro y con un nucléolo único.

Estos folículos primordiales aún no presentan receptores para la FSH (hormona folículo estimulante), lo que significa que aún no han sido reclutados para iniciar el desarrollo folicular. (Gavilanes, 2002)

1.4.2.2. Folículo primario.

Folículo que contiene a un óvulo revestido por: La zona pelúcida (aquí se inicia su síntesis y aparece por primera vez). Una o más capas de células granulosas (folículo primario unilaminar, folículo primario multilaminar, respectivamente). Externamente está limitada por la Teca Conectiva. Es llamado también folículo en crecimiento. El folículo tiene un diámetro de unos 100-120 μm . 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. El ovocito de la oveja experimenta un gran crecimiento llegando a medir alrededor de 60 μm . (Lim, 2001)

1.4.2.3. Folículo secundario o preantral.

Paralelamente, las células de la granulosa que rodean externamente al antro, formarán la pared del folículo secundario. Estas células forman la granulosa externa, cuya organización es estratificada, donde las células del estrato basal sintetizan una lámina basal de ubicación periférica o excéntrica, a quien le suprayace el estroma ovárico. (Gavilanes, 2002)

Al final de esta etapa las células del estroma aumentan de tamaño y forman la teca interna, que luego es invadida por capilares que la nutren, al igual que con 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)

La mayor parte de los folículos que llegan a esta etapa del desarrollo experimentarán atresia, pero algunas de las células de la granulosa (celgranu), relacionadas con los folículos atrésicos. En esta fase el ovocito alcanza su tamaño máximo. El folículo mide unos 200 μm de diámetro medio. Consta de un ovocito que alcanza casi su tamaño máximo (80- 104 μm), 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. (Cabodevila & Teruel, 2001)

1.4.2.4. Folículo terciario o antral.

A este folículo se agrega una cavidad líquida o antro cuyo fluido contiene hormonas producidas por la unidad paracrina teca-granulosa estrógenos fundamentalmente. Esta cavidad hace que el ovocito primario ocupe una posición excéntrica, rodeado por tres capas de células de granulosa (futura corona radiada), lo que se denomina cúmulo ooforo. Al alcanzar un tamaño de 2mm está en condiciones de enganchar con la estimulación de las gonadotropinas FSH y LH, y así entrar en la fase de crecimiento exponencial. Estos folículos en la oveja tienen un diámetro superior a 200-250 μm según distintos autores. (Gavilanes, 2002)

1.4.2.5. Folículo preovulatorio o de Graaf.

Durante el proceso de reproducción, conforme el ovocito se prepara para ser liberado, el tejido circundante se ahueca y se llena de líquido, al tiempo que se desplaza hacia la superficie del ovario. Esta masa de tejido, líquido folicular y ovocito, recibe el nombre de folículo de Graaf. (Arthur, Noakes, & Pearson, 2003)

En el interior de este folículo se encuentra el ovocito que será expulsado del ovario en el momento de la ovulación hacia la trompa uterina (trompa de Falopio) para encontrarse con el espermatozoide y ser fecundado. Conforme el antro va creciendo, el ovocito se ve desplazado excéntricamente y se sitúa en una acumulación de células de la granulosa denominada cúmulus ooforus. Las células de la granulosa que se disponen alrededor del ovocito constituyen la corona radiada. En la oveja, estos folículos tienen un diámetro superior a 800-900 μm y el ovocito mide entre 140-143 μm . (Hasler, 2002)

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, 2000)

1.4.3. *Maduración del óvulo.*

Es la última fase de la culminación de la meiosis. Comienza en las fases tempranas del desarrollo fetal. Los ovocitos 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 ovocitos de los folículos maduros, dando lugar a los ovocitos secundarios. La división separa de nuevo en la metafase de la segunda división meiótica, terminándose rápidamente en el caso de que haya fecundación. (Cole & Cup, 2006)

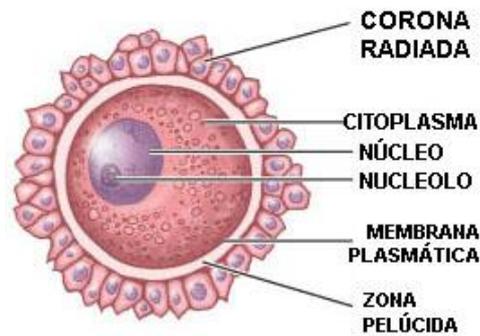
1.5. *OVOCITO.*

Durante la maduración del ovocito, se producen una compleja serie de modificaciones en el citoplasma, junto con la maduración meiótica del núcleo y ciertos cambios en la membrana, con el fin de preparar a este ovocito para ser fecundado con éxito y poder mantener la primera fase de desarrollo embrionario. (Gavilanes, 2002)

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 p.m de diámetro se encuentran rodeados de varias capas de células que constituyen el cúmulo. (Sánchez, 2000)

La ruptura de las células del cúmulo se lleva a cabo por diferentes enzimas liberadas por los espermatozoides. (Arthur, Noakes, & Pearson, 2003)

FIGURA 3. ESTRUCTURAS DEL OVOCITO



Fuente: PALMA, G. 2003. Biotecnología de la reproducción.

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 nucléolo que 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)

1.5.1. Estructura del ovocito

1.5.1.1. 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, que se combinan para formar una capa de alrededor de 15µm de grosor rodeando al ovocito y tiene un espesor total de 0.015-0.020 mm. (Laing, W. J., & W. C., 2006)

1.5.1.2. Membrana plasmática.

En su gran mayoría está formada de fibras proteínicas, con los receptores proteínicos necesarios para adhesión del esperma, los cuales a su vez se encuentran ligados a los receptores de esperma 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. (Bayer & Rubén., 2010)

1.5.1.3. Pronúcleo ovular.

Es el núcleo del ovocito y que contiene la mitad de la información genética del individuo.

Durante la fecundación los pronúcleos de un óvulo y al menos un espermatozoide se fusiona para crear el núcleo único del cigoto. (Alvariño & Ubilla, 2003)

1.5.1.4. Gránulos corticales.

Son moléculas que están en vesículas en la cara interna o citoplasmática de la membrana del ovulo tienen 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)

1.5.1.5. Espacio perivitelino.

Espacio que queda entre el ovocito y la zona pelúcida que lo envuelve, en el que son liberados los cuerpos polares en el momento de la maduración, de un grosor aproximado de entre 0,2 y 0,4 micras. (Cabodevila & Teruel, 2001)

1.5.2. Clasificación de los ovocitos.

La morfología del citoplasma y las células del cúmulus son los primeros criterios para discriminar entre ovocitos competentes o incompetentes para el desarrollo embrionario, la calidad de las células que rodean el ovocito y la apariencia homogénea de citoplasma son los mejores indicadores para determinar si el ovocito posee potencial para madurar y fecundar in vitro las células del cúmulus son subpoblaciones de células de la granulosa que aportan los nutrientes al ovocito durante su crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida , y sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización. (Azada, 2000)

Por lo tanto los ovocitos se pueden clasificar según estos criterios, según las capas de células del cúmulus y la homogeneidad y apariencia del citoplasma, aunque las categorías de clasificación varían en número según los autores con importancia científica y para controlar la calidad de la producción y recolección de los ovocitos , existen clasificación de 2 ,3 y 4 categorías, las que he valorado como más relevante, el tipo A corresponde a un ovocito corresponde a un ovocito con células del cúmulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente; el tipo B tiene capas múltiples del cúmulus (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras; el tipo C se caracteriza por tener un cúmulus desnudo y un citoplasma irregular con zonas oscuras. Aunque por otra parte un ooplasma negro indica que el ovocito está envejecido y tiene bajo el potencial para soportar el desarrollo. (Bayer & Rubén., 2010)

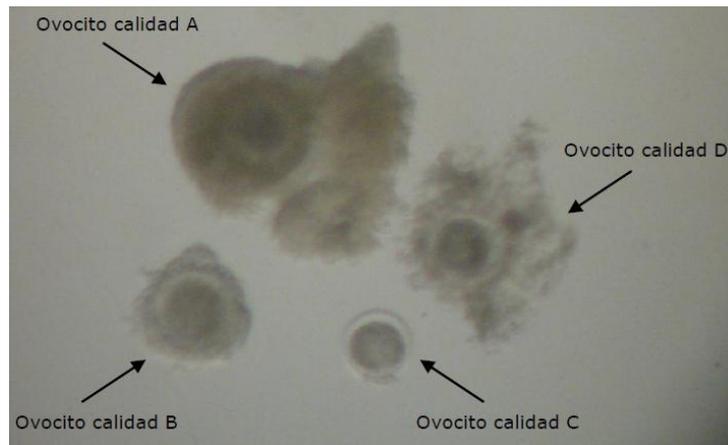
Se los puede clasificar en cuatro tipos:

- Tipo A: ovocito con células de cúmulus con capas múltiples mayor a 4, compactas y con citoplasma homogéneo y transparente.
- Tipo B: capas múltiples de cúmulus de 1 a 3 con citoplasma homogéneo

y zonas periféricas oscuras.

- Tipo C: cúmulus desnudado con citoplasma irregular con zonas oscuras. (Palma, 2003).

FIGURA 4. TIPOS DE OVOCITOS POR SU CALIDAD



Fuente: LAING J.A.; W.J. Brinley Morgan; W.C. Wagner; 2006. Fertilidad e Infertilidad en la Práctica Veterinaria.

1.6. ESTADO MADURATIVO DE LOS OVOCITOS.

En la forma estructural 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-oolema está la llamada zona pelúcida, que es de naturaleza glicoproteica y tiene un grosor de 15-20 micras que disminuye tras de la fecundación. (Ramirez, 2005)

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. 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 *cúmulus 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. (Ramirez, 2005)

1.7. MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE OVOCITOS.

Se realiza a partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios donde se maximiza el número de ovocitos de buena calidad recuperados que pueden ser usados para la maduración, fecundación y cultivo in vitro. (Cole & Cup, 2006)

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

1.7.1. Aspiración de líquido folicular.

Es un procedimiento que tiene por objeto extraer el líquido folicular del interior de los ovocitos 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)

1.7.2. 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)

1.7.3. 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. (Cabrera & Fernández, 2006)

1.8. CRIOPROTECTORES

Los crioprotectores (CP) son de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana celular, 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. (Palma, 2003)

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 No. 2 Crioprotectores más utilizados en reproducción asistida para óvulos y embriones de distintas especies.

Crioprotector	Tipo de célula	Especies ejemplo
PERMEABLES		
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
NO PERMEABLES		
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). Cryoprotectants, en: Fertility Cryopreservation. 1st Edition. Cambridge. Cambridge (United Kingdom), 24-37.

1.8.1. Crioprotectores permeables.

Son generalmente compuestos de bajo peso molecular, necesarios durante el proceso de criopreservación. La mayoría de éstos, son capaces de penetrar al embrión a temperatura ambiente o superiores, siendo su penetración parcial, requisito indispensable para su protección, 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. (Cabodevila & Teruel, 2001)

1.8.1.1. Etilenglicol.

Reemplazan el agua intracelular minimizando la formación de cristales. Regulan la deshidratación y protegen la estructura proteica. 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 y el control en el porcentaje de blastocistos obtenidos. (Cabrera & Fernández, 2006)

1.8.2. Crioprotectores no permeables.

Los CP no permeables o extracelulares, son compuestos de alto peso molecular que normalmente se utilizan asociados a agentes CP permeables. Estos ejercen su efecto crioprotector promoviendo una rápida deshidratación celular aumentando el gradiente osmótico y ayudando indirectamente a la incorporación por parte de las células del CP permeable, favoreciendo así la deshidratación de la célula.

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. (Magaña, 2011)

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

2.1 Ubicación de la Investigación.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

2.1.2 Condición geográfica

2.1.1.1. Ubicación Política.

Provincia: Cotopaxi.

Cantón: Latacunga.

Parroquia: Juan Montalvo.

Barrio: Yugsiloma.

Sector: Rural

2.1.2. Ubicación Geográfica

Latitud: 0°54'01.5"S

Longitud: 78°35'29.4"W

Altitud: 2777.011 m.s.n.m

2.1.3. Datos meteorológicos.

Temperatura promedio: 10 °C

Pluviosidad: 155 mm anuales

Horas luz/día: 12 horas

Viento: Sureste-Noreste

Nubosidad anual: 4.9/8.

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 ovejas de las cuales se obtuvieron los ovarios.

2.3. Tipo de Investigación.

2.3.1. *Experimental.*

Detalla las características más importantes del problema en estudio, en lo que respecta a su origen y desarrollo. Su objetivo es describir un problema en una circunstancia temporo-espacial determinada, es decir, detallar cómo es y cómo se manifiesta, en este caso la calidad de los ovocitos obtenidos por tres las técnicas (aspiración folicular, slicing y exposición folicular).

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 No. 3 ESQUEMA DEL ANÁLISIS DE VARIANZA (ADEVA)

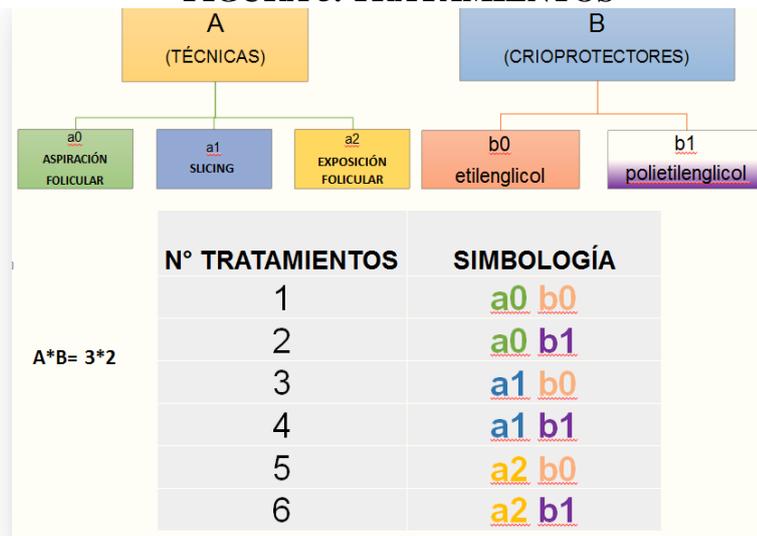
FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
TOTAL	17
A (TÉCNICAS)	2
B (CRIOPROTECTORES)	1
A*B (TÉCNICAS *CRIOPROTECTORES)	2
ERROR EXPERIMENTAL	12

FUENTE: directa

ELABORADA POR: Edgar Romero, 2015

2.5.1. TRATAMIENTOS.

FIGURA 5. TRATAMIENTOS



FUENTE: DIRECTA

ELABORADA POR: Edgar Romero, 2015

2.5.2. UNIDADES EXPERIMENTALES.

En la unidad de estudio se obtendrá una población de 18 animales hembras.

Se realizara a partir de ovarios recuperados provenientes de animales que van a ser sacrificados para su posterior traslado al laboratorio. En donde Los ovocitos serán recolectados a través de la aspiración folicular para su observación y clasificación.

2.6. DESARROLLO DEL ENSAYO.

Para realizar esta investigación se seleccionara 18 ovejas que serán faenadas para lo cual se deberá seguir el protocolo que se describe a continuación:

- Seleccionar animales en el camal.
- Recolectar los ovarios de los animales faenados.
- Una vez extraídos colocar en un termo con cloruro de sodio al 0.9% con la finalidad de mantener intactas las estructuras.
- Llevar al laboratorio el material biológico es en el transcurso de 2 horas.
- Una vez en el laboratorio se procederá a retirar las estructuras anexas de los ovarios que aún estén impregnadas como ligamentos, tejido adiposo, fascias.
- Posteriormente se realizará un lavado adicional de los ovarios con el objetivo de quitar las impurezas restantes.

Semanalmente se utilizara 18 ovarios recolectados de ovejas sacrificadas para aplicar el experimento de la tesis el cual tendrá una duración de 3 semanas por tanto se requerirá un total de 30 ovarios.

a. Método de aspiración.

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

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

c. 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 ante el lente del estereomicroscopio.

Evaluar la cantidad, calidad y madurez de ovocitos.

Se llevará 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 cúmulus con capas múltiples mayor a 4, compactas y con citoplasma homogéneo y transparente.
- Tipo B: capas múltiples de cúmulus de 1 a 3 con citoplasma homogéneo y zonas periféricas oscuras.
- Tipo C: cúmulus desnudado con citoplasma irregular con zonas oscuras.
- Una vez encontrados los ovocitos de tipo A (inmaduros) se procede a lavar en diversas gotas de holding colocadas en una caja petri diferente hasta que estén completamente limpios.
- En otra caja petri se coloca 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 absorbe un segmento de etilenglicol, se deja un espacio de aire, se absorbe los ovocitos, se deja un espacio de aire y otro segmento de etilenglicol para posteriormente sellar la pajilla con un tapón de embriones, pvc o bolitas.

- Luego se enciende la criocconservadora, se llena de nitrógeno líquido y se ubica 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 espera 5 minutos y empieza la curva, la misma que se demora de 1 a 2 horas.
- Luego se realizará 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 puede sacar las pajillas desde -23°C a -33°C para luego ser colocada en un termo de nitrógeno líquido.

POST DESCONGELACIÓN

Descongelar las pajillas luego de un mes y evaluar con la ayuda del estereomicroscopio si la calidad continúa o ha degradado.

El protocolo a seguir para llevar a cabo la descongelación es la 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 pajuela.
- Descongelar en agua a 37°C durante 45 segundos.
- Corta el extremo de la pajuela 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.

CAPITULO III.

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En el capítulo actual se detallan los resultados obtenidos en la parte experimental, los mismos que están en base al proceso de experimentación, los análisis estadísticos y las representaciones graficas de las variables: técnicas de obtención de ovocitos, crioprotectores, número de ovocitos y calidad de ovocitos pre y post criopreservación.

PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO A*B.

En el análisis Trifactorial propiamente utilizaremos las variables cualitativas, la primera variable (v1) como la técnica (aspiración, exposición y slicing), la segunda variable (v2) la B (crioprotectores), y la tercera variable (v3) (preconservación y posconservación) y la variable cuantitativa la cantidad de ovocitos obtenidos.

2.1. Técnicas de obtención de ovocitos

CUADRO NO. 4 NÚMERO DE 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	46	A	16
				B	16
				C	14
2	12	EXPOSICIÓN FOLICULAR	103	A	50
				B	27
				C	26
3	12	SLICING	63	A	18
				B	23
				C	22

Fuente: directa

Elaborado por: Edgar Romero

Pre- Conservación.

Factores inter-sujetos.

		N
TECNICAS	ASPIRACION FOLICULAR	6
	EXPOSICIÓN FOLICULAR	6
	SLICING	6
CRIOPROTECTORES	ETILENGLICOL	9
	POLIETILENGLICOL	9

Fuente: Directa.

Autor: Edgar Romero.

Estadísticos descriptivos

Variable Dependiente: OVOCITOS

TÉCNICAS	CRIOPROTECTORES	Media	Desviación típica	N
ASPIRACIÓN FOLICULAR	ETILENGLICOL	2,6667	,57735	3
	dimension2 POLIETILENGLICOL	2,6667	,57735	3
	Total	2,6667	,51640	6
EXPOSICIÓN FOLICULAR	ETILENGLICOL	8,3333	,57735	3
	dimension2 POLIETILENGLICOL	8,3333	,57735	3
	Total	8,3333	,51640	6
SLICING	ETILENGLICOL	3,3333	,57735	3
	dimension2 POLIETILENGLICOL	3,3333	,57735	3
	Total	3,3333	,51640	6
Total	ETILENGLICOL	4,7778	2,72845	9
	dimension2 POLIETILENGLICOL	4,7778	2,72845	9
	Total	4,7778	2,64699	18

Fuente: Directa.

Autor: Edgar Romero.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: OVOCITOS

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	115,111 ^a	5	23,022	69,067	,000
Intersección	410,889	1	410,889	1232,667	,000
TECNICAS	115,111	2	57,556	172,667	,000
CRIOPROTECTORES	,000	1	,000	,000	1,000
TECNICAS * CRIOPROTECTORES	,000	2	,000	,000	1,000
Error	4,000	12	,333		
Total	530,000	18			
Total corregida	119,111	17			

a. R cuadrado = ,966 (R cuadrado corregida = ,952)

Fuente: Directa.

Autor: Edgar Romero.

Cuadro No. 5 OVOCITOS

Duncan^{a,b}

TECNICAS	N	Subconjunto	
		1	2
ASPIRACION FOLICULAR	6	2,6667	
SLICING	6	3,3333	
EXPOSICIÓN FOLICULAR	6		8,3333
Sig.		,069	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,333.

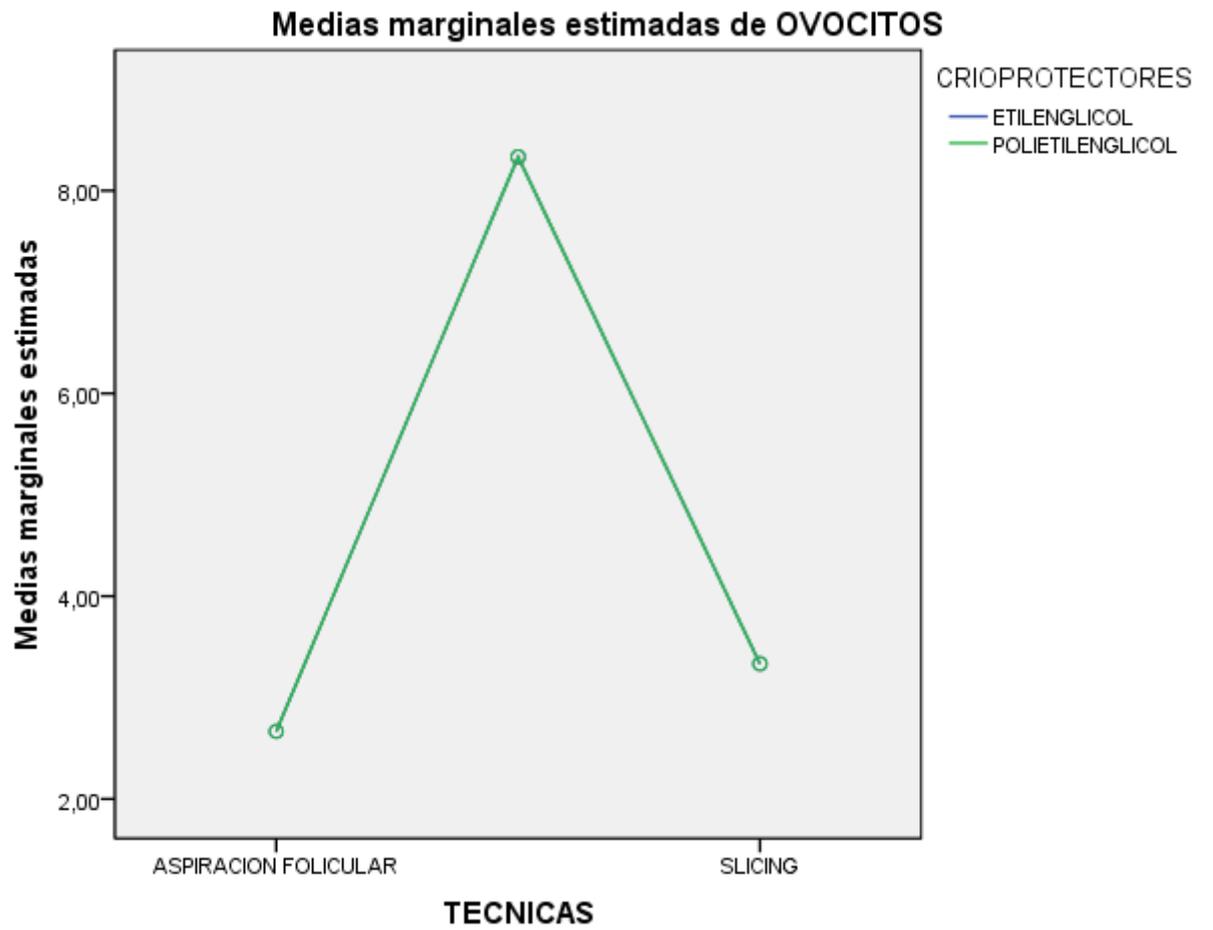
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

b. Alfa = ,05.

Fuente: Directa.

Autor: Edgar Romero.

Gráficos de perfil



Post- Conservación.

CUADRO NO. 6 FACTORES INTER-SUJETOS

		N
TECNICAS	ASPIRACIÓN FOLICULAR	6
	EXPOSICIÓN FOLICULAR	6
	SLICING	6
CRIOPROTECTORES	ETILENGLICOL	9
	POLIETILENGLICOL	9

Fuente: Directa.

Autor: Edgar Romero.

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: OVOCITOS

TECNICAS	CRIOPROTECTORES	Media	Desviación típica	N
ASPIRACIÓN FOLICULAR	ETILENGLICOL	2,6667	,57735	3
	POLIETILENGLICOL	1,3333	1,15470	3
	Total	2,0000	1,09545	6
EXPOSICIÓN FOLICULAR	ETILENGLICOL	8,3333	,57735	3
	POLIETILENGLICOL	4,3333	,57735	3
	Total	6,3333	2,25093	6
SLICING	ETILENGLICOL	3,3333	,57735	3
	POLIETILENGLICOL	2,0000	,00000	3
	Total	2,6667	,81650	6
Total	ETILENGLICOL	4,7778	2,72845	9
	POLIETILENGLICOL	2,5556	1,50923	9
	Total	3,6667	2,42536	18

Fuente: Directa.

Autor: Edgar Romero.

CUADRO NO. 7 PRUEBAS DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS

Variable dependiente: OVOCITOS

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	94,667 ^a	5	18,933	42,600	,000
Intersección	242,000	1	242,000	544,500	,000
TECNICAS	65,333	2	32,667	73,500	,000
CRIOPROTECTORES	22,222	1	22,222	50,000	,000
TECNICAS * CRIOPROTECTORES	7,111	2	3,556	8,000	,006
Error	5,333	12	,444		
Total	342,000	18			
Total corregida	100,000	17			

a. R cuadrado = ,947 (R cuadrado corregida = ,924)

Fuente: Directa.

Autor: Edgar Romero.

Cuadro No. 8 OVOCITOS

Duncan ^{a,b}

TECNICAS	N	Subconjunto	
		1	2
ASPIRACIÓN FOLICULAR	6	2,0000	
SLICING	6	2,6667	
EXPOSICIÓN FOLICULAR	6		6,3333
Sig.		,109	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,444.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

Cuadro No. 8 OVOCITOS

Duncan ^{a,b}

TECNICAS	N	Subconjunto	
		1	2
ASPIRACIÓN FOLICULAR	6	2,0000	
SLICING	6	2,6667	
EXPOSICIÓN FOLICULAR	6		6,3333
Sig.		,109	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

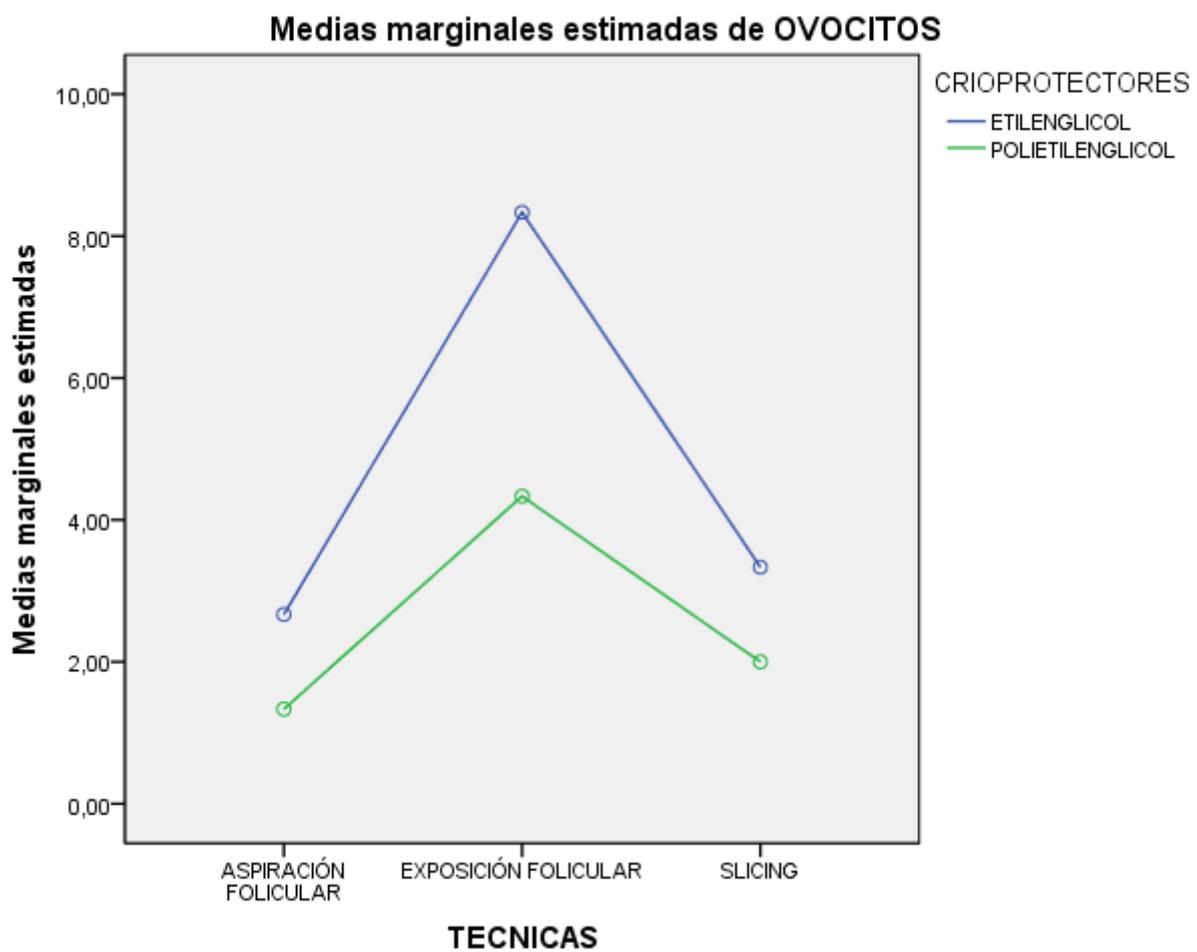
Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,444.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

b. Alfa = ,05.

Gráficos de perfil



Análisis.

El análisis del cuadro de salida utilizando el SPSS con un nivel de significancia del 5% con el estadístico “F” se establece:

- La significancia de la interacción entre la variable (v1) como la técnica (aspiración, exposición y slicing), la segunda variable (v2) la B (crioprotectores), $0.064 > 0.05$ por tanto se acepta la hipótesis nula de la igualdad de los efectos es decir las técnicas como los crioprotectores en su interacción producen efectos iguales.
- La significancia de la interacción la variable (v1) como la técnica (aspiración, exposición y slicing), la segunda variable (v2) la B (crioprotectores), y la tercera variable (v3) (preconservación y posconservación) y pre –post $0.001 < 0.05$ y se acepta la hipótesis alternativa, por consiguiente la técnica, crioprotectores y pre –post tiene diferencias significativas en la cantidad de ovocitos.

Para determinar cuáles tratamientos son diferentes entre si, utilizamos la prueba Duncan que es una prueba de rango que asignan rangos a medias de grupo y calculan un valor de rango.

Para los factores pre-post conservación se observa dos categorías, la de exposición en primer lugar y la aspiración y slicing en segundo lugar; considerando una determinada técnica y la conservación.

Por otra parte podemos observar mejor los efectos con las medias y los intervalos de confianza.

Y finalmente con el grafico se evidencian los efectos entre los factores antes mencionados siendo el etilenglicol mejor.

CONCLUSIONES.

Mediante el trabajo investigativo realizado se logró evaluar las tres técnicas empleadas en la extracción de ovocitos (aspiración folicular, slicing, exposición folicular) junto a los dos crioprotectores (etilenglicol y polietilenglicol) en ovejas post-mortem, donde se puede concluir:

- Se logró evaluar la producción de embriones mediante las tres técnicas empleadas en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi dando buenos resultados.
- Mediante las tres técnicas empleadas se ha podido determinar que la más viable es exposición folicular, otorgando ovocitos excelentes resultados en la práctica realizada.
- La técnica de exposición folicular es aquella que ofrece ovocitos de buena calidad Tipo A con abundante células de cúmulus.
- Fundamentándonos en los resultados obtenidos el tratamiento recomendable para la obtención de ovocitos y posterior crioconservación, es la técnica de exposición folicular más etilenglicol, la cual brinda excelentes resultados en cuanto a cantidad y calidad de los ovocitos recuperados.

RECOMENDACIONES.

- Se debe tener mayor experiencia al momento de realizar las tres técnicas para así obtener material genético de buena calidad.
- Al momento de la clasificación e identificación de los ovocitos se debe tener en cuenta algunos parámetros a considerar, por ende se recomienda tener más tiempo y una mayor cantidad de células para realizar el estudio.
- Debemos tener conocimiento para poder aplicar las técnicas mencionadas en el estudio valiéndonos de información recolectada.

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.
- Alvariño, J. M., & Ubilla, E. (2003). *Fisiología reproductiva 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.).
- Bayer, & Rubén. (Lunes. de Octubre. de 2010). *Producción ovina*. Recuperado el 13 de Mayo. de 2015, de Producción ovina.: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina/105-contrastacion.pdf
- Cabodevila, J., & Teruel, M. (2001). *Criopreservación de embriones bovinos. En: Biotecnología 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*, 80-90.
- 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.
- Cole, H. H., & Cup, P. T. (2006). *Reproducción de los animales domésticos* (Tercera ed.). Zaragoza, España: Acribia.
- Córdova, A., Peláez, J., Domínguez, J., Peña, F., & Alegre, B. (2001). *Posibilidades Futuras del Uso de Semen Congelado* (Vol. III). Visión Técnica.

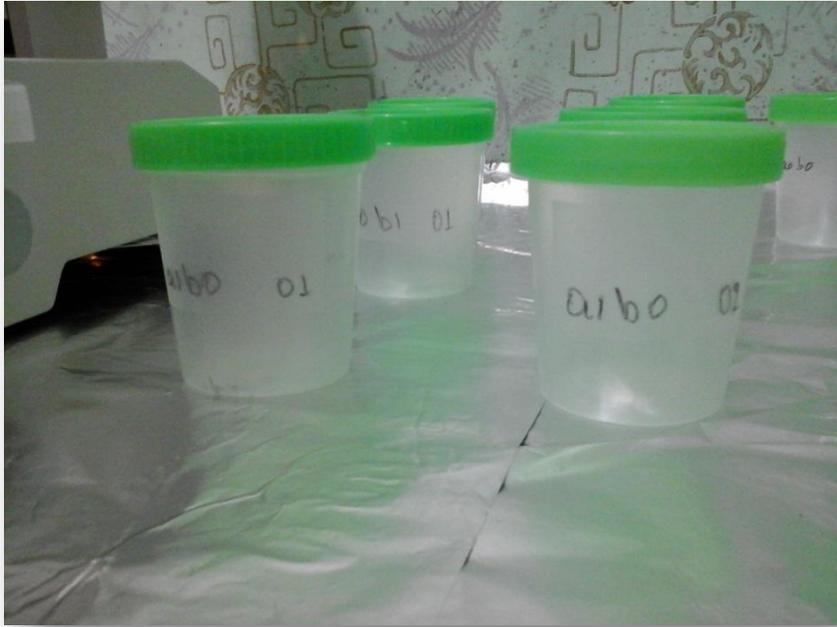
- Córdova, A., Peláez, J., Domínguez, J., Peña, F., & Alegre, B. (2001). *Posibilidades Futuras del Uso de Semen Congelado*. (Vol. III). Visión Técnica.
- Fernández, A. M. (2000). *Instrumentos de laboratorio*. E.U.I.T.
- Gavilanes, D. (Martes de Julio de 2002). *Histología Reproductiva*. Recuperado el Sabado. de Junio. de 2015, de Histología Reproductiva.:
http://www.histologia.uchile.cl/contenidos/ovario/foliculos_ovaricos/foliculos_primordiales/foliculos_primordiales.html
- Gutiérrez Carretero, E., Bello Puentes, R., Borrego Dominguez, J. M., Hernández Fernández, A., Muñoz García, J., Prieto González, M. F., y otros. (Septiembre de 2000). Criopreservación cardíaca a temperatura subcero: estudio de la función sistólica y diastólica. *Revista española de cardiología*, 53(09), 1175-1185.
- 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. 456-460). México, México: Mc Graw-Hill Interamericana.
- 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.
- Magaña, R. (Agosto. de 2011). *Maestría en Ciencia Animal*. Recuperado el Junio. de 2015, de Maestría en Ciencia Animal.:
<http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/30460/4/GulMagana.pdf>

- Murillo, J. (24 de 11 de 2010). MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN DE ENFOQUE EXPERIMENTAL.
- Nusshag. (2006). *Anatomía y Fisiología de los animales domésticos* (Septima ed.). Zaragoza, España.
- Palma, G. (2003). *Biología de la reproducción*. Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Ramirez, J. (Viernes de Agosto de 2005). *Fertilidad*. Recuperado el Domingo. de Junio. de 2015., de Fertilidad:
<http://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/recomendaciones/clasificacion.pdf>
- Rebollar, P. G. (2000). *Jornadas Profesionales de Ovinocultura de la Real Escuela de Sitges*, (págs. 38-46). Sitges.
- Rebollar, P. G., Lorenzo, P. L., Carneiro, G. F., & Liu I., K. M. (2005). *Maduración de ovocitos en ovejas*. 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.
- Rojas Cairampoma, M. (2015). Tipos de Investigación científica: Una simplificación de la complicada incoherente nomenclatura y clasificación. *Revista electrónica de Veterinaria*, 16(1).
- Ruiz, J., & Correa, J. (2007). *Desarrollo partenogénico in vitro con ovocitos vitrificados bovinos*. *Biología de la reproducción*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA.
- Sánchez. (2000). Anatomía y Fisiología de Ovinos. En B. A. García Jose, *Anatomía y Fisiología de Animales Domésticos*. (págs. 78-80). España.: Mc Graw Hill.
- Shively, M. J. (2008). *Anatomía Veterinaria Básica, comparativa y clínica. Manual Moderno* (Sexta ed.). Estados Unidos.
- Vizcarra, G. (Jueves. de Febrero de 2006). *Ovogénesis*. Recuperado el martes. de mayo de 2015, de Ovogénesis.:
<http://www.bioreproducción.com/trabajos81/ovogenesis/ovogenesis.shtml>
- World Health Organization. (2005). *Manual de bioseguridad en el laboratorio* (Tercera ed.).

ANEXOS.

Anexo 1

Numeración de materiales a utilizar.



Anexo 2

Distribución de los ovarios.



Anexo 3
Crioprotectores.



Anexo 4.

Cortes y extracción de ovocitos.



Anexo 5.
Lavado de Ovocitos.



Anexo 6.
Colocando una gota de Holding.



Anexo 7.
Realizando la Técnica de Aspiración Folicular.



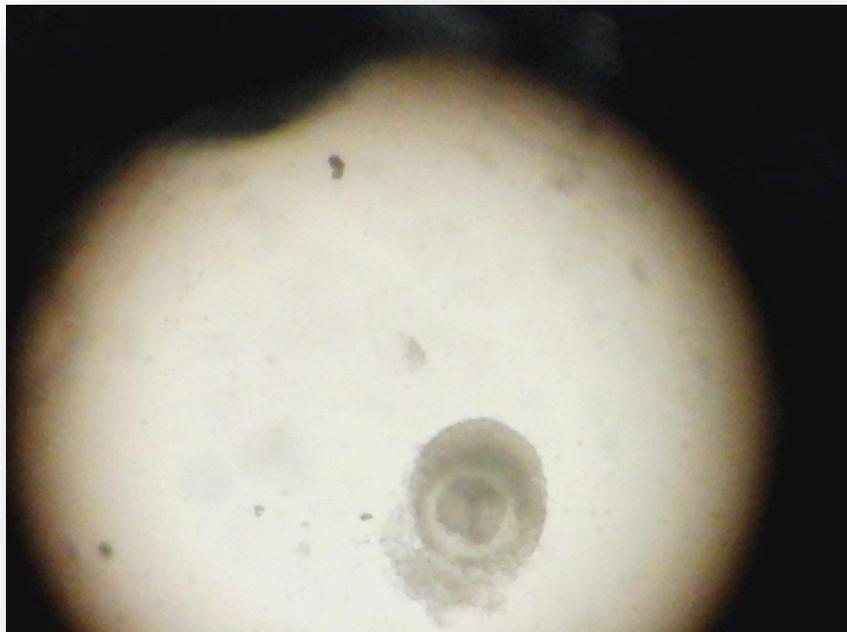
Anexo 8.
Realizando un corte longitudinal.

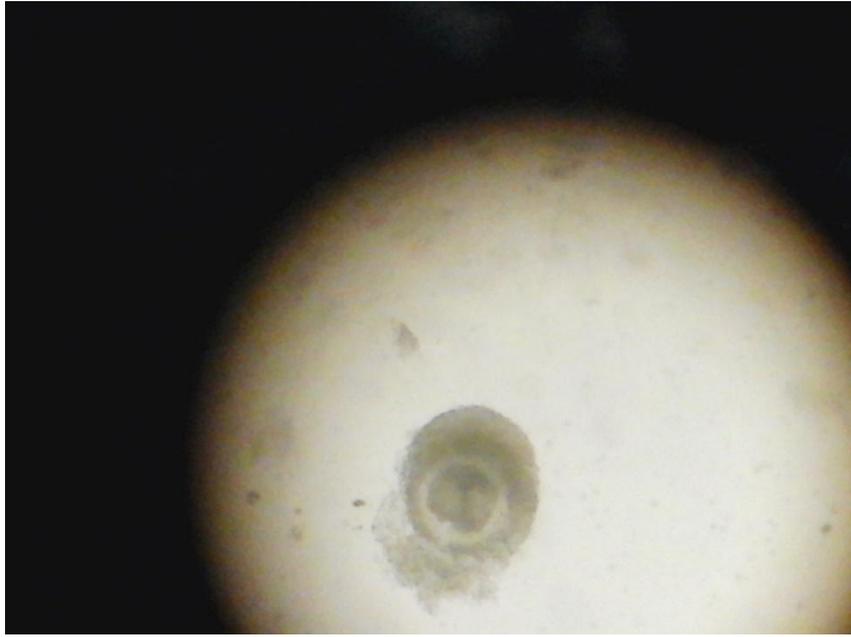


Anexo 9.
Regulando el estéreo microscópico.

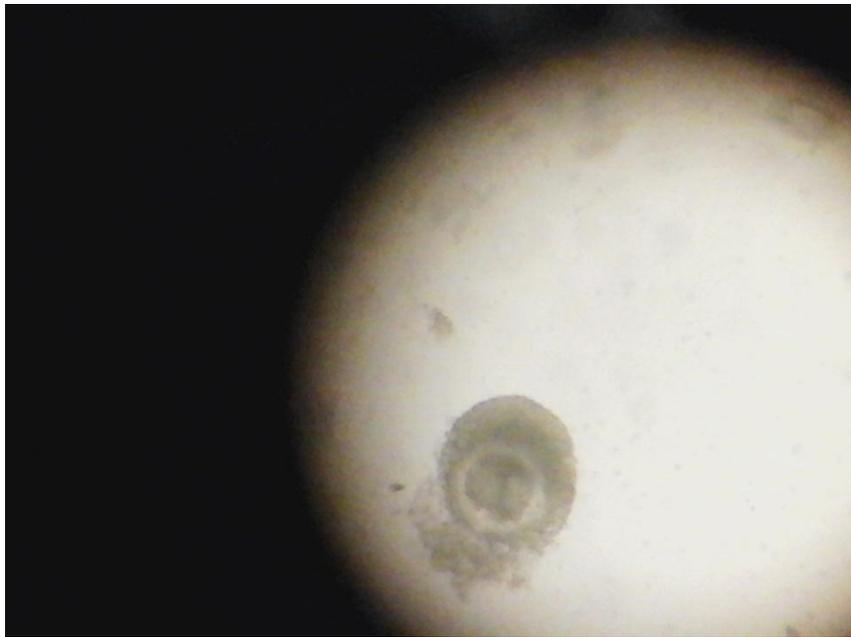


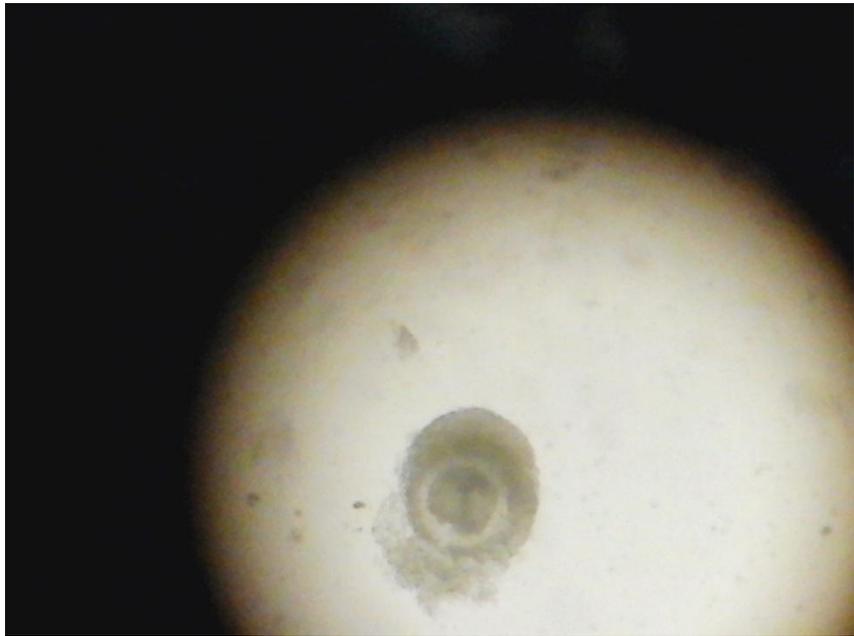
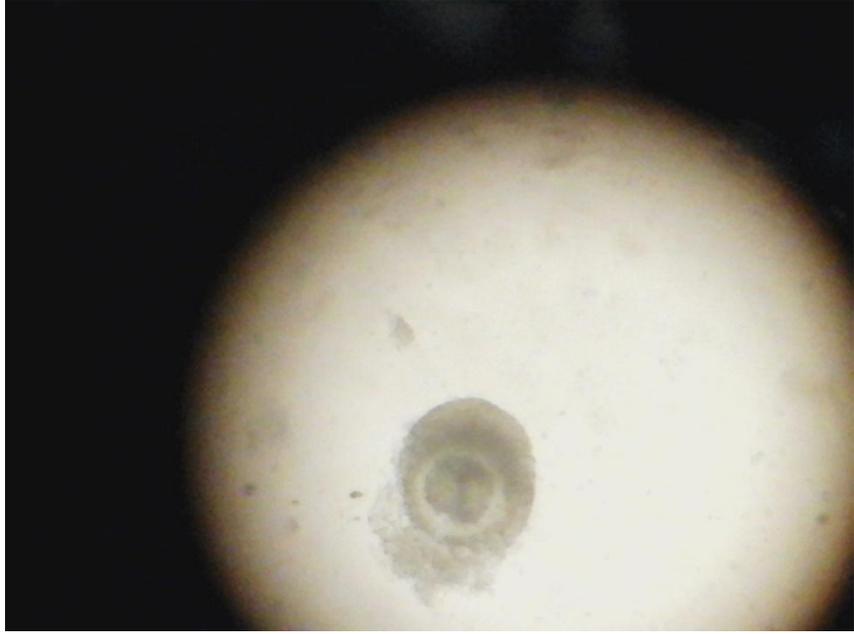
Anexo 10.
Observación del Ovocito.

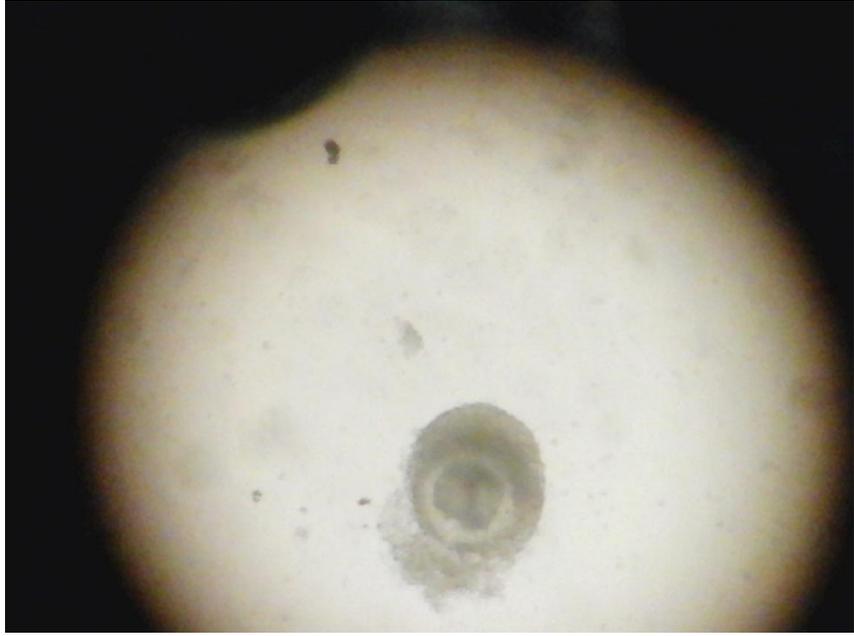




Anexos 11.
Observación de Ovocitos Tipo A.







Anexos 12.

Observación de Ovocitos Tipo B.



Anexos 13.

Observación de Ovocitos Tipo C.

