

# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**



## **UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES.**

### **CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

#### **TRABAJO DE TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.**

**TÍTULO: “EVALUACIÓN DE CRIO CONSERVACIÓN DE  
OVOCITOS EN HEMBRAS CANINAS EN EL LABORATORIO  
DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA  
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA”.**

#### **AUTOR**

Diego Calderón Chango

#### **DIRECTORA DE TESIS**

MVZ. Paola Lascano

**COTOPAXI – ECUADOR 2015**

## **DECLARATORIA DE AUTORIA**

El contenido de este trabajo práctico, escrito, y las ideas aportadas por el director de la tesis en esta investigación son exclusivas del autor de quien escribe y la representa en este documento investigativo que puede ser utilizado como fuente investigativa acerca de la cría y conservación de ovocitos en hembras caninas, en el campo de medicina veterinaria y la autoría de quien escribe y la representa.

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 reglamento y por la normativa institucional vigente.

**AUTOR: Diego Alejandro Calderón Chango**

**C.I. 1715836191**

## **CARTA DE APROBACION DEL DIRECTOR DE TESIS**

En mi calidad de directora de tesis titulada “CRIOCONSERVACION DE OVOCITOS CANINOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”. Propuesto por la autoría, Diego Alejandro Calderón Chango, como requisito previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista, de acuerdo con el Reglamento de Títulos y Grados, considero que el trabajo mencionado reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

.....  
MVZ. Paola Lascano

DIRECTORA DE TESIS

Latacunga, Junio 2015

**CARTA DE APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL**

“CRIOCONSERVACION DE CANINOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”. DE COTOPAXI.”

Fue revisado por los siguientes miembros del tribunal.

.....  
Dra. Mg. NANCY CUEVA  
PRESIDENTE DE TRIBUNAL

.....  
Dra.Mg.JANETH MOLINA  
SECRETARIO DE TRIBUNAL

.....  
MVZ. CRISTIAN ARCOS  
MIEMBRO DE TRIBUNAL

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar agradezco a Dios por haberme guiado por el buen camino por darme salud, vida y sobre todo por la oportunidad de cumplir una meta más en mi vida.

A mi casa de estudios Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad Técnica de Cotopaxi por ofrecerme la formación profesional.

A mi directora de tesis MVZ. Paola Lascano por haber apoyado incondicionalmente en el presente trabajo. A la Dra. Mercedes Toro por la orientación profesional y el tiempo dedicado a lo largo del mismo.

A mi familia especialmente a mi hija, esposa y a mis padres por darme el apoyo y la fuerza incondicional que me brindaron a lo largo de mi formación académica y de mi vida profesional.

Diego Alejandro Calderón Ch.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta investigación a la asociación de Médicos Veterinarios dedicados a pequeñas especies y espero que el presente trabajo fortalezca y mejore el manejo de la población Canina en busca de fortalecer las características genéticas para un mejor desempeño de acuerdo a las exigencias de nuestro país.

Además va dedicado a todas las personas que a lo largo de mi vida han sido fuente de inspiración y han hecho esto posible en especial a mi familia.

Diego Alejandro Calderón Ch.

## **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”

.....

**Diego Alejandro Calderón Ch.**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b> .....	<b>11</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>11</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
HIPÓTESIS .....	16
<b>CAPITULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>1 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA</b> .....	<b>1</b>
1.1 FISILOGIA REPRODUCTIVA GENERAL .....	1
1.2 ANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA PERRA .....	2
1.2.1 OVARIOS.....	2
1.2.2 TROMPA UTERINA O OVIDUCTO .....	2
1.2.3 ÚTERO .....	2
1.2.4 VESTÍBULO VAGINAL .....	3
1.2.5 CLÍTORIS.....	3
1.2.6 VULVA.....	3
1.3 EL CICLO ESTRAL DE LA PERRA .....	3
1.3.1 PROESTRO .....	4
1.3.2 ESTRO .....	5
1.3.3 METAESTRO .....	5
1.3.4 ANESTRO .....	6
1.4 GAMETOGÉNESIS .....	6
1.4.1 ESPERMATIGÉNESIS.....	6
1.4.2 OVOGÉNESIS .....	8
1.5 DESARROLLO DE LAS CÉLULAS GERMINATIVAS DE LA HEMBRA.....	9
1.5.1 CRECIMIENTO DE LOS OVOCITOS .....	10
1.5.2 OVULACIÓN Y FERTILIDAD EN LA PERRA .....	11
1.5.3 CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS.....	12
1.5.4 CLASIFICACION DE LOS COCs COMPLEJO OVOCITOS CUMULUS .....	13

1.6	COLECCIÓN DE OVOCITOS.....	16
1.6.1	MÉTODO DE ASPIRACION FOLICULAR.....	16
1.6.2	MÉTODO DE ASPIRACIÓN.....	16
1.6.3	MÉTODO DE CORTE.....	17
1.7	CRIOCONSERVACION.....	17
1.7.1	TÉCNICAS DE CRIO CONSERVACIÓN.....	20
1.7.1.1	CONSERVACIÓN A TEMPERATURA AMBIENTE.....	20
1.7.1.2	REFRIGERACIÓN.....	21
1.7.1.3	CONGELACIÓN ESTANDAR.....	21
1.7.1.4	COGELACIÓN RÁPIDA Y ULTRA RÁPIDA.....	22
1.7.1.5	COGELACIÓN LENTA.....	24
<b>CAPITULO II.....</b>		<b>25</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
2.1	UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	25
2.2	RECURSOS MATERIALES.....	25
2.2.1	MATERIALES DE OFICINA.....	25
2.2.2	MATERIALES DE LABORATORIO.....	26
2.2.3	REACTIVOS.....	26
2.3	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	26
2.4	METODOLOGÍA.....	27
2.4.1	MÉTODO ESTADÍSTICO.....	27
2.4.2	TÉCNICA ESTADÍSTICA.....	27
2.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
2.5.1	UNIDAD DE ESTUDIO.....	28
2.6	MANEJO DEL ENSAYO.....	28
<b>CAPÍTULO III.....</b>		<b>30</b>
<b>3</b>	<b>ANÁLISIS Y DISCUIÓN DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
3.1	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	30
3.2	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	35
<b>CONCLUSIONES:.....</b>		<b>37</b>
<b>RECOMENDACIONES:.....</b>		<b>38</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>39</b>
	Referencias bibliográficas.....	39

Referencias Virtuales .....	40
<b>ANEXOS.....</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Ovocitos rodeados de 6 capas de células del cúmulus.....	14
Gráfico 2 Ovocitos rodeados de 2 capas de células de cumulus.....	14
Gráfico 3 Ovocitos con pocas células de cumulus.....	15
Gráfico 4 Ovocitos desnudos.....	15
Gráfico 5 Calidad de ovocitos.....	31
Gráfico 6 Ovocitos Calidad I.....	33
Gráfico 7 Porcentaje de Ovocitos Caninos recuperados y crioconservados.....	35

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Cuadro de Variables e indicadores.....	28
Tabla 2 Total de ovocitos caninos recuperados y clasificados según su calidad.....	30
Tabla 3 Ovocitos de calidad 1 maduros e inmaduros.....	32
Tabla 4 Total de ovocitos de calidad I.....	33
Tabla 5 Total de ovocitos calidad Inmaduros Crioconservados.....	34

## RESUMEN

El presente trabajo investigativo es sobre la **“Evaluación de crio conservación de ovocitos en hembras caninas en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria”**, el mismo que se enfoca en evaluar la crioconservación de ovocitos de hembras caninas con la finalidad de determinar si son viables antes y después de la crio conservación. Este trabajo investigativo es importante puesto que, busca mejorar las características genéticas de la población Canina para un mejor desempeño de acuerdo a las exigencias de nuestro país.

Este proceso de inicio con la recolección de ovocitos por aspiración folicular colocados en un medio holding para su limpieza, posteriormente se evaluarán ante un estereoscopio, los ovocitos de calidad 1 en estado maduro se empaquetará directamente para su crioconservación, mientras que los que se encuentran en estadio inmaduro se pasaron a un crio conservante; para su maduración y posterior realización del proceso de crio conservación de los mismos con una curva lenta.

Es necesario mencionar que el estado morfológico es solo un factor de los varios que indican la plena viabilidad de un ovocito para ser utilizado en la crioconservación, pero el hecho de haber obtenido el 100% de ovocitos viables, nos alienta a proseguir en esta carrera que sin duda es larga y demanda de mucho sacrificio, dedicación e inversión económica, pero nos deja la satisfacción de no quedarnos solo con los problemas, sino encontrar soluciones y alternativas que nos permitan liberarnos de los temores y descubrir los beneficios de los cuales hemos estado privados.

**TOPIC:** EVALUATION OF CRYOPRESERVATION OF FEMALE CANINE OOCYTES IN THE BIOTECHNOLOGY LABORATORY, IN THE FIELD OF VETERINARY SCIENCES.

**AUTHOR:** DIEGO ALEJADRO CALDERON CHANGO

### **ABSTRACT**

This researching work is on the "Evaluation of cryopreservation of female canine oocytes in the biotechnology laboratory in the field of veterinary sciences", also it focuses on evaluating oocyte cryopreservation of canine females in order to determine whether they are viable before and after cryopreservation. This researching work is important because it seeks to improve the genetic characteristics of the canine population for a better output according to the demands of our country.

This process began with the collection of oocytes and placed in holding for cleaning. Furthermore, they were assessed before a stereoscope quality oocytes mature stage 1 will be packaged directly for cryopreservation, while those who are in immature stage would be transferred to a cryoprotectant; for maturation and subsequent cryopreservation process with a slow curve.

Needless to say, the morphological state is only one factor of several that indicate the full viability of an oocyte to be used in cryopreservation. Nevertheless, the fact of having obtained 100% of viable oocytes, encourages us to continue in this field of study which is certainly long and demands a lot of sacrifice, dedication and financial requirements. The satisfaction don't have those problems and finding solutions and alternatives, allows us to free ourselves from the fears and discover the benefits of which we have been deprived.

## INTRODUCCIÓN

Todos los sistemas y funciones que se investiga hasta ahora son indispensables para la supervivencia del animal; sin embargo como más pronto o más tarde sobreviene la muerte, se hace precisa la función de otro sistema que evite la extinción de la especie animal tomando en cuenta nuevas alternativas que está revolucionando en la Medicina Veterinaria como es: la crio conservación de ovocitos para conservar la genética de una especie canina determinada.

Los datos que proporcionó el presente estudio son positivos y servirán de aporte a criadores de razas de perros con pedigrí, estudiantes, técnicos dedicados a la crioconservación y muy particularmente a los dueños de mascotas que han convertido a estos pequeños seres como parte de la familia ya que, con la presente investigación se logró demostrar que se pudo conservar el ovocito de la hembra canina para luego proceder a la fertilización con el semen canino para perpetuar las características fenotípicas y genotípicas de cierta raza una vez que ha cumplido su fase de vida o está en peligro de extinción. También se podrá realizar en perras que no pueden ser madres y que los propietarios exigen camadas de esa raza.

Como enseña la genética, aunque la descendencia que producen los animales sea de su misma especie y responda al mismo patrón corporal, no quiere decir que aparezcan copias idénticas de sus progenitores ya que, estos lo único que hacen es pasar, mediante unas células especiales, a la siguiente generación una información que por lo general es la responsable del desarrollo de la formación corporal y de los caracteres propios de la especie canina, junto con numerosas características individuales heredables, aun cuando aparezcan variaciones en todas estas características, de modo que raramente las camadas de la misma especie poseen la misma combinación de caracteres.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la crioconservación de ovocitos de hembras caninas en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar un protocolo de crioconservación de ovocitos caninos obtenidos de ovarios de hembras caninas post- ovariectomía.
- Evaluar la calidad de los ovocitos en función de las características morfológicas presentes en los mismos mediante microscopía.
- Establecer el porcentaje de viabilidad de los ovocitos crio conservados.

## **HIPÓTESIS**

- **Ho.-** Se logrará crioconservar los ovocitos de hembras caninas en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

**Hi.-** No se logrará crioconservar los ovocitos de hembras caninas en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

## **CAPITULO I**

### **1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

#### **1.1.FISIOLOGIA REPRODUCTIVA GENERAL**

En la práctica veterinaria con pequeñas especies los médicos localizan diversas situaciones que requieren cierto grado de especialización en los aspectos reproductivos que les permita actuar de acuerdo a la fisiología reproductiva de esta especie.

De la capacidad de reproducción depende el mantenimiento de cada especie, puesto que todos tienen un periodo limitado de vida activa, seguido de síntomas característicos de vejez y finalmente la muerte. A través de los tiempos, la falta o insuficiencia de la información fisiológica ha perdido una gran cantidad de especulaciones, de tal forma que se puede afirmar que sobre el sistema reproductor se ha dicho y escrito sobre cualquiera de los demás sistemas (**ILLERA, 2006**).

En la reproducción, el punto clave es el logro de la supervivencia de la especie, no de la del individuo, y se conoce que, en algunos casos, la reproducción puede incluso producir la muerte del progenitor. Aunque el sexo de los animales queda determinado por los cromosomas aportados por los gametos, cada embrión tiene potencialmente capacidad de desarrollar los caracteres propios de ambos sexos. La génesis de las gónadas en los vertebrados se hace a partir de las eminencias genitales, que están íntimamente relacionadas con el mesonefros(**ILLERA, 2006**).

En su primera etapa, las gónadas son todavía biopotenciales desde el punto de vista sexual y se distingue en ellas una zona cortical (organización femenina) y otra medular(organización masculina). Luego, las células germinales primordiales,

procedentes del epitelio germinal, invaden la eminencia genital con el fin de formar cordones primarios con caracteres sexuales, y a partir de este momento pierde la gónada su biopotencialidad y se inicia la diferencia sexual (ILLERA, 2006).

## **1.2. ANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA PERRA**

### **1.2.1. Ovarios**

Se encuentran alojados dentro de la bolsa ovárica, que se abre en la cavidad peritoneal a través de una hendidura en su lado interno. Los ovarios se hallan unidos por el ligamento propio del ovario al útero y por el ligamento suspensorio del ovario a la última costilla. Su forma es elipsoidal, su tamaño es variable según la raza y el aspecto de su superficie cambia según el estado del ciclo estral en que se encuentre la hembra. Tiene dos funciones la producción de óvulos y la secreción de hormonas.

(WANKE, 2006)

### **1.2.2. Trompa uterina o oviducto**

Es un tubo (uno en cada ovario) que corre por la pared de la bolsa ovárica y que termina en un infundíbulo provisto de franjas llamadas fimbrias. Su función es la de transportar los óvulos hasta el cuerno uterino. (VALERA, 2008)

### **1.2.3. Útero**

Es un órgano tubular que se divide en dos cuernos, cuerpo y cuello. Los cuernos son largos y se encuentran ubicados junto a la pared abdominal y alojan fetos durante la gestación. Los ligamentos anchos suspenden al útero de la región sublumbar. El ligamento intercornual une a ambos cuernos cerca del cuerpo del útero. El cuerpo del útero es corto y limita cranealmente con la bifurcación de los cuernos y caudalmente con el cuello o cérvix. Su función es la de transportar los óvulos y espermatozoides.

En caso de gestación, allí se produce la nidación de los huevos o cigotos, los futuros cachorros. (ILLERA, 2006).

El útero se encuentra formada también por tres capas: serosa, que en definitiva es una prolongación del peritoneo; muscular, llamado miométrio y constituida por dos capas de fibras (circulares y longitudinales); mucosa o endometrio, sujeta a una serie de variaciones periódicas según el estadio del ciclo estral del animal. (ILLERA, 2006)

#### **1.2.4. Vestíbulo vaginal**

Es el espacio comprendido entre la vagina y la vulva. La uretra se abre en la cresta uretral el suelo de la región craneal del vestíbulo vaginal.

Su función es para la cópula. (CABREJOSSOLANO, 2008)

#### **1.2.5. Clítoris**

Es el homólogo en la hembra del pene, y está en el suelo del vestíbulo vaginal pero más cerca de la vulva. Su función es la estimulación sexual. (CERVANTES, 2005)

#### **1.2.6. Vulva**

Es el orificio urogenital externo de la perra. Tiene dos labios fusionados por arriba y dejan por debajo la hendidura bulbar o rima pudenda, constituyendo las comisuras dorsal y ventral de la vulva, respectivamente. Su función es urogenital, esto es, mixta: para la monta y como final del aparato urinario. (HERNANDEZ, 2010)

### **1.3.EL CICLO ESTRAL DE LA PERRA**

El nombre del ciclo estral se deriva del latínooistros que significa “deseo imperioso”. (ILLERA, 2006)

La hembra canina pasa por diferentes fases de actividad y descanso hormonal que se repiten cíclicamente. Es lo que denominamos ciclo estral y consta de 4 estadios: proestro, estro, diestro y anestro. El primer celo aparece entre los seis y diez meses de edad, y experimenta un nuevo ciclo ovárico cada seis meses aproximadamente. Sin embargo, el intervalo interestral (periodo transcurrido desde el final del estro hasta el comienzo del siguiente proestro) puede variar desde los 3,5 meses hasta los trece meses, siendo estos valores extremos relacionados con hembras de baja o nula fertilidad, exceptuando algunas razas (ejm: Basenji) que ciclan de forma rutinaria cada 12 meses. (ESQUIVEL,2007).

Entre los 2 y 6 años de edad las hembras son relativamente constantes tanto en la duración de su ciclo como el intervalo entre ellos. A partir de los 7 años, una vez pasada la edad reproductiva óptima, es probable que sucedan múltiples modificaciones como incremento progresivo del intervalo interestral, reducción del tamaño de las camadas en perras de cría, aumento de defectos congénitos y problemas durante el parto. (WANKE, 2006)

### **1.3.1. Proestro**

La duración en el proestro dura entre 3 y 7 días, con una media de 9 días. El comportamiento de la hembra se caracteriza por la tracción de perros machos, En esta fase la hembra no permite que el macho monte. El cambio físico de la vulva está edematoso y típicamente hay una descarga vaginal serosanguinolenta que se origina en el útero. En el examen vaginoscópico muestra una vagina suave, rosada y edematosa. El lumen vaginal a menudo es difícil de visualizar. (CUNNINGHAM, 2007)

Durante este período tiene lugar el crecimiento y maduración del folículo, estimulado por la liberación de FSH. Esta gonadotropina está presente en el torrente circulatorio

como consecuencia de la salida de nivel de progesterona que inhibía su liberación; precisamente en los primeros días del proestro. (ILLERA, 2006)

### **1.3.2. Estro**

El término estro, comprende el lapso durante el cual la perra permite que el macho la monte y copulen. El primer día en que la hembra permite el apareamiento (aceptación del macho) es el comienzo del estro, y esta fase finaliza cuando ella ya no acepta más la cubrición. Para detectar se pasa la mano por la zona lumbar de la perra o por la simple proximidad e un macho, la hembra menea el rabo y expone la vulva, postura característica de aceptación a la cópula. Hay una mayor edematización de la vulva aunque disminuye la secreción bulbar, que se va aclarando al haber cada vez menos eritrocitos. En el útero se produce proliferación endometrial, y en la vagina edematización y formación de pliegues profundos. Esta fase del ciclo tiene una duración de 5 a 10 días, aunque la perra solo acepta al macho entre 24 y 96 horas. Se caracteriza por la ruptura del folículo, la posterior ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo. Hormonalmente, tras el pico de Lh, vemos un aumento de la progesterona que nos será muy útil cuantificar si deseamos que la perra quede gestante. (HERNANDEZ, 2010)

### **1.3.3. Metaestro**

También llamado diestro, es el periodo que sigue a la cópula y se asocia con la actividad del cuerpo lúteo. Comienza con la cesación de la aceptación del macho y finaliza cuando las concentraciones séricas de progesterona regresan a los niveles basales. Ocurriendo la destrucción del cuerpo lúteo. En el útero, secreción, restauración y descamación del endometrio. La mucosa vaginal se encuentra rosada y con pliegues poco profundos. Si la perra ha sido cubierta, es la fase de la nidación gestación y lactación. Si no lo ha sido, en esta fase muchas perras pueden tener pseudogestación. (MARTINEZ, 2013)

Dependiendo de ello, esta fase dura entre 3 y 5 meses por término medio. Es la fase de la progesterona, que sufre un aumento brusco, pasa por una fase de meseta y cae paulatinamente, momento en que comienza el anestro. (CUNNINGHAM, 2007)

#### **1.3.4. Anestro**

Es el período de involución uterina. En una perra preñada comenzaría el parto y finalizara con el proestro siguiente. En cambio, el comienzo del anestro no es clínicamente detectable en la perra no preñada. ¿Qué es lo más característico? ;que no ocurre nada clínicamente ni hay alteraciones en el comportamiento. El útero, la vagina y la vulva no presentan modificaciones ante la ausencia casi total de cambios hormonales. Solo al final del anestro hay un aumento de la FSH y de los estrógenos. Es el periodo óptimo para realizar la ovariectomía (OVH) para el control de la población canina. (HERNANDEZ, 2010)

### **1.4. GAMETOGENESIS**

La transformación de las células germinales en gametos constituye la gametogénesis. En los animales, la gametogénesis da lugar a gametos femeninos: óvulos, en las hembras y gametos masculinos: espermatozoides en los machos. La formación de óvulos y espermatozoides son procesos que presentan grandes similitudes. No obstante, existen importantes diferencias, por lo que hay que distinguir un gametogénesis masculina: espermatogénesis y gametogénesis femenina: ovogénesis. (VILLALOBOS, 2015)

#### **1.4.1. Espermatogénesis**

La formación de los espermatozoides tiene lugar en las gónadas masculinas: los testículos. En los vertebrados y en los insectos los testículos son órganos compuestos

por numerosos túbulos seminíferos que convergen en conductos comunes que llevan el espermatozoides maduro al exterior. El examen microscópico de estos túbulos seminíferos permite reconocer fácilmente el curso de la espermatogénesis y distinguir sus diferentes fases (VILLALOBOS, 2015).

#### **1.4.1.1. Fase de proliferación o multiplicación**

Pegadas a la pared del túbulo se encuentran unas pequeñas células que se multiplican activamente por mitosis, son las espermatogonias (VILLALOBOS, 2015).

#### **1.4.1.2. Fase de crecimiento**

Las espermatogonias que quedan hacia la luz del túbulo experimentan una etapa de crecimiento y pasan a denominarse espermatozoides primarios o de primer orden (VILLALOBOS, 2015).

#### **1.4.1.3. Fase de maduración**

Los espermatozoides primarios van a sufrir la primera división de la meiosis transformándose en espermatozoides secundarios. La segunda división de la meiosis produce unas células haploides llamadas espermátidas por cada espermatozoides primario se producen cuatro espermátidas (VILLALOBOS, 2015).

#### **1.4.1.4. Fase de diferenciación o espermiogénesis**

Las espermátidas no son todavía los gametos, antes deben experimentar una serie de transformaciones, anatómicas, etapa llamada espermiogénesis, al final de la cual quedaran convertidas en espermatozoides. Estos están formados por las siguientes partes: cabeza, pieza intermedia y cola o flagelo (ORTEGA, 2015).

## **1.4.2. Ovogénesis**

El desarrollo de los óvulos tiene lugar en las gónadas femeninas: **los ovarios**. En este órgano las células madres germinales sufren un complicado proceso en el que se pueden distinguir las siguientes fases (**VILLALOBOS, 2015**).

### **1.4.2.1. Fase de proliferación o multiplicación**

Las células madres germinales se multiplican por mitosis dando ovogonias (**VILLA, 2007**).

### **1.4.2.2. Fase de crecimiento**

Las ovogonias atraviesan una fase de crecimiento y se convierten en ovocitos de primer orden, también con cromosomas. A diferencia de la espermatogénesis el crecimiento es considerable, ya que el ovulo es el gameto portador de la mayoría de las sustancias necesarias para el desarrollo del embrión. (**VILLALOBOS, 2015**).

### **1.4.2.3. Fase de maduración**

Una vez que el ovocito primario ha completado su crecimiento está ya preparado para atravesar las dos divisiones de la meiosis y transformarse en una célula haploide con  $n$  cromosomas: la ovótida (**KRUIP, 2000**).

Una peculiaridad muy importante de la ovogénesis es que mediante la meiosis el ovocito no se divide en cuatro células iguales sino que la mayoría del citoplasma queda en una sola de ellas, la que dará lugar al ovulo. Así, cada ovocito primario da lugar a un único ovulo. Las otras tres restantes muy pequeñas, se denominan corpúsculos polares y se trata en realidad de gametos abortivos que permanecen un

tiempo adosados al ovulo hasta que terminan por atrofiarse y desaparecer. (VILLALOBOS, 2015).

#### 1.4.2.4. Fase de diferenciación

La ovótida se transforma en el ovulo. En general no se trata de una fase de transformación están acusadas como sucede en el espermatozoide. El óvulo es una célula haploide de gran tamaño, pues almacena sustancias nutritivas en forma de granos vitelo. Como cualquier otra célula está cubierta de membrana plasmática (DE LOS REYES, 2011).

Por estas razones y procesos la gametogénesis es la primera fase de la producción sexual de los animales. Durante esta fase el proceso esencial es la transformación de ciertas células de los padres en células especializadas: los óvulos en las hembras y los espermatozoides en los machos. El primer paso en la producción de gametos es una proliferación, más o menos rápida, de las células por mitosis ordinaria. Las células que proliferan en los testículos se llaman **espermatogonias**; las células que proliferan en los ovarios se llaman **oogonias**. Una vez que la proliferación cesa, las células se llaman **espermatoцитos** en el macho y **oocitos en las hembras**. Entonces éstas entran en fase de crecimiento y luego a una fase de maduración (ILLERA, 2006).

### 1.5. DESARROLLO DE LAS CÉLULAS GERMINATIVAS DE LA HEMBRA

Es el proceso de desarrollo de las células germinativas de la hembra. Incluye la formación y la maduración de las células e incluye tres procesos:

- **Proliferación:** es una etapa fetal, mitótica en la que se forma un número determinado de oocitos primarios que más tarde van a cumplir una función, pero

muchos de ellos desaparecen al momento del nacimiento. (DE LOS REYES, 2011).

- **Crecimiento:** en esta fase del ovocito aumenta de tamaño, se forma la zona pelúcida, células de la granulosa y células de la teca, los óvulos migran al interior del ovario. Esta es una fase meiótica que comienza antes de la pubertad (ESQUIVEL, 1987).
- **Maduración:** esta etapa se da después de la pubertad, la primera meiosis se da en plena ovulación y la segunda meiosis en el momento de la fertilización. La primera división meiótica da origen al ovocito secundario y la eliminación del primer cuerpo polar. Aquí se lleva a cabo la ovulación. La segunda división meiótica se activa por el nemaspermo en el óvulo y produce al cigoto y al segundo cuerpo polar. (HERNANDEZ, 2010)

### 1.5.1. Crecimiento de los ovocitos

En muchos grupos de animales, notablemente en los vertebrados, el oocito está rodeado durante todo el tiempo de su crecimiento y maduración por células especiales de ovario, las **células foliculares**. En los mamíferos las células foliculares proceden del epitelio germinal de los ovarios, e inicialmente el oocito joven está rodeado por una capa de células foliculares, que forman un epitelio cuboidal sencillo alrededor del oocito (RECOSTI, 2007).

Posteriormente, el número de células del folículo aumenta notablemente, disponiéndose en varias capas. Una membrana la zona pelúcida, se desarrolla entre las células del folículo y la superficie del oocito. A medida que el huevo se aproxima a la madurez aparece una cavidad excéntrica en la masa de las células del folículo. Esta cavidad se llena de líquido segregado, presumiblemente, por las células del folículo. En esta fase se llama **folículo de Graf**. (RECOSTI, 2007).

### **1.5.2. Ovulación y fertilidad en la perra**

La ovulación ocurre 2 días después del pico de LH. Sin embargo, de manera diferente a las demás especies, los ovocitos son liberados como ovocitos primarios y solo maduran y son capaces de ser fertilizados hasta un tiempo después de la ovulación en el segmento distal de los oviductos (**WANKE, 2006**).

La maduración de los ovocitos puede presentarse hasta 2 o 3 días después de la ovulación o 4 o 5 días después de la onda de LH. La vida fértil de los ovocitos maduros puede ser 2 o 3 días, por lo que las montas durante el estro, 7 a 8 días después de del pico de LH, pueden ser fértiles. La gestación después de cruza que se efectúan 9 o 10 días posteriores al pico de LH es poco frecuente y producen camadas de pocos cachorros, uno o dos y la duración del paro es de entre 55 y 57 días entre la cruza y el parto. (**KRUIP, 2000**)

Cruzas no deseadas o forzadas de un poco más de 2 días antes del pico de LH también es poco frecuente que sean fértiles y en el que caso de que lo sean la gestación es de alrededor de 68 días. Se ha demostrado que el espermatozoide canino tiene la capacidad de permanecer fértil en el tracto de la perra hasta 6 o 7 días antes de que se presente la fertilización. El pico de fertilización parece estar asociado con cruza entre el día 0 y 5 después del pico de LH (**RECOSTI, 2007**).

Considerando la relativa constante del tiempo de gestación 65 días pudiendo ser un día más o un día menos, midiéndolo en relación al pico de LH, es posible medir el tiempo de varios eventos individuales en la gestación con un grado razonable de exactitud. Sin embargo, muchos de los eventos individuales de la gestación en la perra solo han sido estudiados en relación al tiempo de una cruza observada o a la presencia del estro, incluyendo la implantación y el desarrollo del feto, la placenta y membranas fetales. Por esto, la estimación debe ser basada en el hecho de que el

promedio de fecha de cruce es un día después de la presentación del pico de LH y 1 día después de la ovulación. (WANKE, 2006)

### 1.5.3. Clasificación de los ovocitos

El **folículo**, formado por un ovocito rodeado por células somáticas, es la organización más frecuentemente presente en los ovarios de los animales. En mamíferos se producen los folículos durante el periodo embrionario, cesando su producción en el periodo perinatal. Desde el nacimiento hasta la pubertad permanecen en estado de reposos hasta que en la pubertad comienzan a madurar periódicamente en grupos más o menos numerosos dependiendo de la especie animal.

Los **folículos de reserva o primordiales** son ovocitos primarios rodeados por una sola capa de células más o menos aplanadas. Se disponen en la periferia del ovario, próximos a la túnica albugínea (RECASTI, 2007).

Los **folículos en maduración** aparecen en la pubertad y se producen hasta la menopausia. En la pubertad algunos de los folículos de reserva empiezan un periodo de maduración que terminará en el estado de folículo de Graff, desde el cual se produce la ovulación. Durante el proceso de maduración, las células que rodean al Ovocitos se vuelven cuboidales formando una capa denominada granulosa. Asimismo, se crea una capa de material extracelular claro entre el Ovocito y la granulosa denominada membrana pelúcida. (LANGFORD, 2005)

En esta fase se dice que tenemos folículos primarios. También se produce un aumento de tamaño del propio Ovocitos. La granulosa aumenta el número de células y el número de capas en torno a la membrana pelúcida. Externamente a la granulosa se organizan células muy aplanadas formando una capa denominada teca, inicialmente con poco espesor, pero que progresivamente se dividirá en una teca interna formada por células más redondeadas y por una teca externa con células más aplanada.(KRUIP, 2000)

El folículo irá creciendo en tamaño y en las células de la gránulos se irán abriendo espacios llenos de fluido y carentes de células. Tenemos entonces el denominado folículo secundario (**VILLAVICENCIO, 2015**).

Posteriormente, los espacios llenos de fluido se fusionan para formar un único espacio denominado antro. En él se encuentra el ovocito rodeado por la membrana pelúcida y unido a la capa de la granulosa por un istmo de células. La capa de la granulosa ha crecido en número de células y en espesor. También la capa de la teca es más espesa y con más células. El crecimiento de la parte somática del folículo hace que éste aumente enormemente de tamaño, denominándose en este estadio **folículo de Graaf**. Es el paso previo a la ovulación. En humanos, el ovocito termina la primera división meiótica en este estadio y por tanto se genera un ovocito secundario, junto con un cuerpo polar (**VILLAVICENCIO, 2015**).

La ovulación consiste en la liberación del ovocito desde el folículo, y desde el ovario, hasta el pabellón de la trompa de Falopio. Junto con el ovocito, rodeándolo, también se libera la membrana pelúcida y una capa de células de la granulosa formando la denominada corona radiada (**LANGFORD, 2005**).

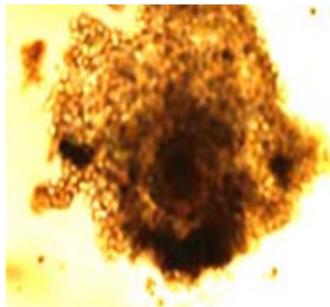
Las células de la granulosa y las de la teca interna del folículo que liberó el óvulo se dividen muchas veces y forman una estructura grande denominada **cuerpo lúteo**. Su misión es producir hormonas como progesterona y estrógenos. Si hay fecundación e implante del embrión en el útero el cuerpo lúteo permanece durante el periodo de embarazo. De lo contrario, se mantiene activo durante unos días y luego cesa su actividad, convirtiéndose en el denominado **cuerpo albicans**, que posteriormente degenera (**VILLA, 2007**).

#### 1.5.4. Clasificación de los cocs (complejo ovocito cumulus)

##### **Categoría I:**

Ovocitos con más de tres capas de células de cumulo compactas y con citoplasma homogéneo uniformemente granulado (RATTO, 2013).

*Gráfico 1: Ovocitos rodeados de 6 capas de células del cúmulus.*

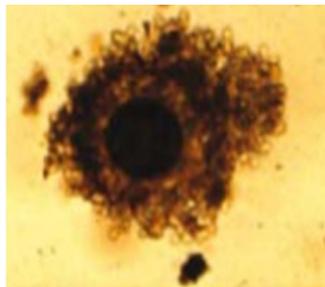


Fuente: (OLSON 2004)

##### **Categoría II:**

Ovocitos con menos de tres capas de células del cumulo y citoplasma generalmente homogéneo (RATTO, 2013).

*Gráfico 2: Ovocitos rodeados de 2 capas de células de cumulus.*

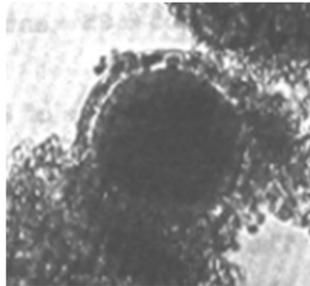


Fuente: (OLSON 2004)

**Categoría III:**

Ovocitos con una sola capa de células del cúmulo y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras (RATTO, 2013).

*Gráfico 3: Ovocitos con pocas células de cumulus.*

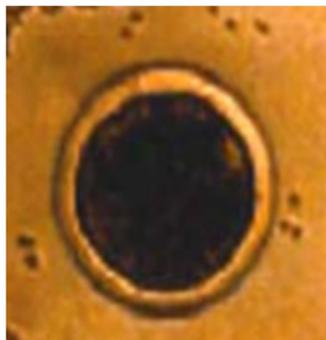


Fuente:(OLSON 2004)

**Categoría IV:**

Ovocitos con cumulus expandido y citoplasma irregular (RATTO, 2013).

*Gráfico 4: Ovocitos desnudos*



Fuente: **(OLSON 2004)**

Los ovocitos se clasificaran como viables (calidad I y II) y no viables (calidad III y IV), para los procesos de maduración y fecundación in vitro **(KRUIP, 2000)**.

## **1.6. COLECCIÓN DE OVOCITOS.**

### **1.6.1. Método de aspiración folicular.**

Los ovarios obtenidos en el matadero serán trasladados en un recipiente isotérmico (termo) al laboratorio. El tiempo transcurrido entre el sacrificio de los animales y la llegada al laboratorio debe ser menos de 6 a 8 horas. Una vez en el laboratorio los ovarios serán lavados 2 a 3 veces con solución fisiológica de 0,9% de NaCl a 35 °C y conservados en la misma solución **(CERVATES,2013)**.

Cada alumno deberá colocarse los guantes quirúrgicos en la mano izquierda con la cual sujetara el ovario secándola previamente con papel toalla y con la otra mano libre sujetara la jeringa y procederá a aspirar el contenido de los folículos.

Los COCs (complejo ovocito-cúmulos) serán aspirados por punción de los folículos de tamaño entre 3 a 8 mm con una jeringa de 5cc y aguja de 18 x 1½ el contenido folicular colectado en la jeringa será vertida en la placa Petri de 100mm y diluida con solución fisiológica de 0,9% de NaCl, con el fin de visualizados **(CORDOVA, 2014)**.

### **1.6.2. Método de aspiración.**

Para la realización de esta investigación se inicia por la recolección de ovocitos por aspiración folicular con jeringa de 10 ml y aguja calibre 22, los ovocitos se colocan en un medio holding para su limpieza y posterior evaluación ante un estereoscopio,

para los ovocitos de calidad 1 en estadio inmaduro se pasaron a un crió conservante con etilenglicol durante 10 minutos, para proceder al empaquetado; para posteriormente realizar la crió conservación de los mismos con una curva lenta, la misma que debe iniciarse en menos 6 grados centígrados, cuando se encuentran las pajillas en menos 10 grados centígrados se realiza el sidring , seguido de los menos treinta a menos cuarenta grados centígrados sacamos las pajillas y las colocamos en el tanque de nitrógeno.(**KRUIP, 2000**)

Para la evaluación de la crió conservación la pajilla se coloca en agua temperada a 37°C y se espera 2 minutos; con la ayuda de una micropipeta universal se extrajo el contenido y se colocó en una caja Petri para ser llevada al estereoscopio donde se examinó cada una de las estructuras de los ovocitos para determinar su calidad y por tanto su viabilidad para así establecer el porcentaje de viabilidad de los ovocitos crió conservados (**VILLAVICENCIO, 2015**).

### **1.6.3. Método de corte**

Los ovarios se transportan al laboratorio en solución salina suplementada con antibióticos, a temperatura entre 30 – 37 grados centígrados. En el laboratorio, se hace remoción del tejido adyacente, del cuerpo lúteo y de sangre con lavados de solución salina y alcohol (**CELESTINOS, 2003**).

## **1.7. CRIÓ CONSERVACIÓN**

Las técnicas de reproducción asistida no sólo ayudan a parejas que no pueden tener hijos, sino también a especies amenazadas. La crió conservación permite congelar material genético y evitar la extinción de animales como el cóndor de California, la gacela africana, el ciervo ibérico o plantas endémicas del Cantábrico. Científicos de todo el mundo trabajan en bancos de recursos genéticos con el objetivo de conservar

el material de todas las especies en peligro, una tarea complicada que requiere de mayores investigaciones y medios (**HERNÁNDEZ, 2013**).

La crioconservación posibilita almacenar embriones de una amplia variedad de especies mamíferas sin que pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos (**TERUEL, 2001**). El empleo de embriones congelados posibilita utilizar eficientemente donantes y receptoras, incorporar progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie, transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia, controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales vivos por la de embriones congelados libre de ellas, crear bancos de embriones de alto valor genético, entre otros (**CELESTINOS, 2003**).

Desde el punto de vista práctico, la principal ventaja de la congelación de embriones, es que permite economizar y aumentar el rendimiento del uso de receptoras, aspecto que significa la mayor inversión en la industria de la transferencia de embriones (**BOGGIO, 2002**).

El empleo de embriones congelados posibilita utilizar eficientemente donantes y receptoras; incorporar progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie; transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia; controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales en pie por la de embriones congelados libres de ellas; crear bancos de embriones de valor canino, entre otras. (**TERUEL, 2001**).

Al conservar embriones a temperaturas extremadamente bajas (-196 °C en nitrógeno líquido) es posible detener casi por completo la actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc.; es decir, reducir drásticamente la actividad fisiológica de la célula. Así es posible almacenar

embriones durante un largo período sin afectar su viabilidad y sin causarles cambios genéticos (**GORDON, 2010**). Este hecho, convierte a la congelación de embriones en una herramienta insustituible para el comercio internacional de reproductores.

En la transferencia de embriones los esfuerzos se concentran en desenvolver nuevos protocolos de inducción de la ovulación múltiple a partir de una nueva generación de hormonas e informaciones básicas sobre la foliculogénesis (**SIQUEIRA, 2008**).

La manipulación en las dietas de las donadoras es también una alternativa para mejorar las respuestas de transferencia de embriones y disminuir los costos. El objetivo es duplicar las tasas medias actuales de 2 a 3 gestaciones/recuperación de embriones y aumentar la frecuencia de recuperaciones a través de lavados uterinos para 6 a 8 por año (**PALMA, 2001**).

La producción “in-vitro” de embriones viene presentando avances considerables y está siendo lentamente incorporada a los proyectos de producción. Con el desenvolvimiento de métodos de punción folicular, se tornó posible la recuperación de ovocitos en hembras vivas para la fecundación “in-vitro”, abriendo nuevos caminos para la multiplicación de animales de interés económico, superando los actuales índices de la transferencia de embriones clásica, en lo que dice al respecto de la producción de ternero/vaca/año. Esta puede ser utilizada en animales jóvenes, gestantes o lactantes y en aquellos con problemas de fertilidad adquiridos (**RESTREPO, 2009**).

La utilización de terneras como donadoras de ovocitos en programas de producción “in – vitro” ofrece un potencial considerable para acelerar la ganancia genética a través de reducción del intervalo entre generaciones. Además de eso, posibilita la oferta constante de embriones para los programas de producción de leche o de carne. La media de ovocitos viables obtenidos por sesión de punción folicular depende de la estrategia adoptada. Así es posible punzar los folículos de una donadora dos veces por semana, una vez por semana o una vez cada dos semanas, siendo que en las dos

últimas alternativas es posible mejorar los resultados mediante la estimulación hormonal (**DODE, 2010**).

Independientemente de la estrategia, el resultado final esperado es de por lo menos una gestación por semana por cada donadora. Estos resultados están vinculados a las condiciones clínicas de las donadoras, ya que buena parte de los animales sometidos a la producción “in vitro” son animales con problemas de fertilidad adquiridos (**PEIXER, 2010**).

A pesar de los avances obtenidos, la programación “in - vitro” aun presenta algunas limitaciones tales como los bajos índices de blastocito, dificultad en la crio preservación de los embriones, menor viabilidad de los ovocitos obtenidos de terneras en relación a los de vacas y novillas, y el costo del embrión que es más alto que el embrión de transferencia de embriones (**DODE, 2010**).

Por tanto, estudios en esa área visan a buscar alternativas para mejorar la maduración citoplasmática de los ovocitos utilizados para PIV y mejores condiciones para el cultivo embrionario con el objetivo de aumentar no solo la tasa de producción de blastocito, sino también la calidad de embriones producidos (**PEIXER, 2010**).

En la actualidad, la crio conservación de embriones de mamíferos ha llegado a ser un procedimiento rutinario en biología, ganadería y medicina, pudiendo lograrse por procedimientos de congelación estándar y por vitrificación. La principal diferencia que tiene la vitrificación con el método estándar es que en este último la concentración de crioprotectores es menor y el descenso de temperatura se realiza de manera controlada mediante equipos programables (**[FAHNING Y GARCÍA, 2010](#)**).

## **1.7.1. Técnicas de crioconservación**

### **1.7.1.1. Conservación a temperatura ambiente**

Un paso indispensable en la transferencia de embriones es la conservación temporal de embriones recobrados de una donadora antes de ser transferidos o congelados, ésta se realiza en un medio de Solución Buffer Fosfato (PBS), suplementado con 10% suero, una fuente de proteínas que reduce la tensión superficial favorece la sedimentación, evita que los embriones se adhieran a algún elemento utilizado para su manipulación, incorpora sustancias promotoras del crecimiento que favorecen su desarrollo, absorbe e inhibe metales pesados tóxicos que puedan estar presentes en el medio. La viabilidad embrionaria declina después de 12 horas ([PALMA Y BREM, 1993](#)).

### **1.7.1.2. Refrigeración**

Ha quedado claro que embriones de bovinos mantenidos en un medio no nutritivo por un largo tiempo y a temperatura ambiente decrecen ampliamente su capacidad de desarrollo, este desarrollo puede ser preservado si los embriones se refrigeran de 0 a 4 °C por no más de 24 horas ([REFSDAL, 1988](#)). La refrigeración se efectúa vehiculizando los embriones en PBS envasados en pajuelas de 0.25 ml y colocadas en un refrigerador. Se utiliza hielo y agua para regular el descenso de la temperatura, de manera similar a como se realiza la estabilización del semen ([LANDSVERK, 1992](#)).

La refrigeración de embriones puede ser considerada como una alternativa interesante cuando no sea posible recurrir a la congelación.

### 1.7.1.3. Congelación estándar

El método de congelación estándar permitió a obtener el primer ternero nacido de la transferencia de un embrión congelado. Al método estándar se le han efectuado desde entonces distintas modificaciones tendientes a su simplificación (WILMUT Y ROWSON, 1973).

En el método de congelación estándar la exposición de los embriones al medio de congelación (PBS + G) debe realizarse a temperatura ambiente (20 - 22 °C), en un solo paso, de 10 a 30 minutos de duración (CHUPIN Y PROCUREUR, 1984; NIEMANN, 1991). Este período incluye el envasado de los embriones en pajuelas plásticas. Esto permite realizar más rápidamente y con mayor precisión la inducción de la cristalización o “seeding” (MAURER, 1978). Las pajuelas deben ser colocadas en un equipo de congelación a -7 °C durante 5 minutos para equilibrar la temperatura de las pajuelas con la del equipo; el seeding se realiza poniendo en contacto la superficie de la pajuela con una placa metálica enfriada con nitrógeno líquido (NL<sub>2</sub>); el agente refrigerante del equipo puede ser nitrógeno líquido alcohol o etanol enfriado por medio de un compresor.

El no inducir la cristalización conduce a la formación de cristales de hielo bajo un estado de súperenfriamiento y a una elevación repentina de temperatura (se genera calor latente de -10° - -15 °C), resultando un severo trauma físico que puede dañar las células (NIEMANN, 1995).

Una vez efectuado el seeding, se mantiene la temperatura estable durante 10 minutos (período de estabilización) y luego se desciende a una velocidad de entre 0.1 y 0.5 °C hasta -30 ó -35 C para establecer un adecuado balance entre deshidratación y formación de hielo intracelular, en este momento las pajuelas pueden ser retiradas del equipo de congelación y sumergidas en nitrógeno líquido. La descongelación se

realiza de manera rápida, sumergiendo las pajuelas en baño María a 30 ó 35 °C durante 20–30 segundos.

#### **1.7.1.4. Congelación rápida y ultra rápida**

Los embriones son deshidratados parcialmente como ocurre en el método estándar, luego se les deshidrata nuevamente colocándolos en una solución mixta de glicerol y sucrosa (CHAUPIN, 2005). Esta segunda deshidratación deja a los embriones en condiciones de ser enfriados rápidamente. Las pajuelas son colocadas en el cuello del termo de nitrógeno, durante 5 minutos, posteriormente son sumergidas al NL. Los resultados obtenidos fueron dispares, según el estadio de desarrollo del embrión congelado.

Se realizaron modificaciones, congelando ovocitos en gradillas de microscopio electrónico con 1 µl de EG sumergiéndolas inmediatamente en NL. Obteniendo tasas de sobrevivencia semejantes a los de ovocitos expuestos al EG, pero sin congelamiento (MARTINO, 1996).

Esta técnica previene la formación de hielo intracelular mediante la deshidratación de la célula. Para conseguirlo, se expone a la célula a altas concentraciones de un crioprotector permeable y, posteriormente, a un enfriamiento rápido o ultrarrápido; los protocolos de congelación rápida y ultrarrápida utilizan altas concentraciones de solutos (crio protectores y azúcares) que eliminan rápidamente el agua de las células (HERNÁNDEZ, 2013).

En estas soluciones, las células se deshidratan rápidamente y se favorece la entrada de los crio protectores, lo que permiten sumergirlas directamente en nitrógeno líquido (congelación ultrarrápida) o vapores de nitrógeno (congelación rápida); las tasas de congelación conseguidas con las técnicas de congelación ultrarrápidas (11000 a 14000°C/minuto) disminuyen drásticamente el daño por enfriamiento, permitiendo

usar soluciones crio protectoras menos concentradas (menos Toxicas) y acortar el tiempo de exposición del ovocito al crioprotector. Se consigue acelerar el momento en que los ovocitos son más sensibles (20 a 12°C). Este hecho es el que conlleva al éxito de la vitrificación, y no el que se forme cristales. La solución de vitrificación más empleada contiene un crioprotector penetrante, el etilenglicol, que entra con facilidad en el ovocito, y un crioprotector no penetrante, la sacarosa, que se mantiene extracelular. El tiempo de equilibración del ovocito en la solución vitrificadora es de 20 a 30 seg. y se hace a temperatura ambiente; posteriormente, se carga en la pajilla y se sumerge en nitrógeno líquido, cuya temperatura es de -196°C. La descongelación se hace en varias fases, ya que se debe colocar al ovocito en soluciones para retirar paulatinamente el crio protector (**HERNÁNDEZ, 2013**).

#### **1.7.1.5. Congelación lenta**

La congelación lenta es una técnica de crioconservación en la que existe un “equilibrio” entre la velocidad de enfriamiento, la velocidad de deshidratación y la formación de núcleos de hielo. El objetivo principal de este tipo de crioconservación es el de controlar la velocidad de enfriamiento de tal forma que a medida que descienda la temperatura se produzca la penetración de crio protector al interior de la célula produciéndose un equilibrio osmótico y disminuyendo la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares (**CORDOVA, 2014**).

A continuación, la temperatura disminuye y se provoca la formación de hielo (ice seeding) dentro de esta solución. A medida que los cristales de hielo crecen, el agua de la solución pasa de líquido a sólido y la concentración extracelular de solutos incrementa provocando la salida de agua de la célula. Cuanto más baja es la temperatura, más cantidad de agua puede convertirse en hielo, pero la capacidad de la célula para eliminar el agua intracelular también disminuye (**CORDOVA, 2014**).

Por lo tanto, el éxito de un protocolo de congelación lenta se basa en alcanzar el equilibrio entre la velocidad a la que el agua abandona la célula y la velocidad con la que esta agua se convierte en hielo; la célula, al perder agua, se deshidrata y, consecuentemente, se produce la penetración de los crio protectores para mantener el equilibrio osmótico. Una vez se alcanza la temperatura de formación de hielo (normalmente entre  $-5$  y  $-9^{\circ}\text{C}$ ), la temperatura debe descender hasta  $-33^{\circ}\text{C}$  /  $-40^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la cual las células pueden ser ya sumergidas directamente en nitrógeno líquido. Las células congeladas según esta metodología deberán descongelarse según protocolos de descongelación rápida; para intentar mejorar el porcentaje de blastocitos obtenidos por ovocito congelado se han introducido variaciones a los protocolos de congelación lenta. Así se ha probado distintos agentes crio protectores como el propilenglicol, el etilenglicol, el DMSO (dimetilsulfóxido) y el glicerol **(CORDOVA, 2014)**

## CAPITULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe la ubicación geográfica donde se ejecutó el estudio, los materiales y equipos utilizados para el proceso, los métodos y técnicas aplicadas.

#### 2.1. Ubicación de la investigación

Este experimento se llevó cabo en la Universidad Técnica de Cotopaxi, cuya ubicación geográfica es:

- **Provincia:** Cotopaxi
- **Cantón:** Latacunga
- **Parroquia:** Eloy Alfaro
- **Barrio:** Salache Bajo
- **Latitud:** 00°59'47.68"
- **Longitud:** Oe 78°37'19.16"ESTE
- **Altitud:** 2800 m.s.n.m.
- **Temperatura:** 14.5°C
- **Pluviosidad:** 800-1200mm.

#### 2.2. Recursos materiales

Para el desarrollo del experimento se utilizó los siguientes materiales e insumos de laboratorio.

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

- Computadora
- Flash memory
- Hojas de papel bond
- Cámara fotográfica
- Esferográfico
- Cuaderno
- Impresora

### **2.2.2. Materiales de laboratorio**

- Caja Petri
- Bisturí
- Jeringas
- Micro pipeta
- Pajillas
- Tapa Pajillas
- Regla para medición de nitrógeno
- Nitrógeno líquido
- Tanque de nitrógeno líquido
- Estereomicroscopio

### **2.2.3. Reactivos**

- Solución holding
- Solución de etilenglicol

### **2.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

En la presente investigación se utilizó el método descriptivo no experimental, mismo que se encuentra detallado en la metodología usada para este proceso.

### **2.4. METODOLOGÍA**

#### **2.4.1. Método estadístico**

El tipo de investigación fue descriptivo y explicativo ya que describimos los hechos como son observados ya que es una manera de recopilar información y comprobar ideas. Es la forma en que se trata de hallar respuestas a interrogantes sobre la naturaleza., formular hipótesis; someter a prueba las hipótesis y llegar a conclusiones de esta manera determinar si es o no efectiva la crioconservación de ovocitos. Estos datos serán posteriormente analizados, tabulados y puestos en conocimiento a quienes sea de su interés. Y de esta manera poder obtener conclusiones y recomendaciones.

#### **2.4.2. Técnica estadística**

Se utilizó el método de gráficos estadísticos y porcentajes ya que en esta investigación no se relaciona con ningún tipo de comparación como para que se aplique otro método estadístico.

### **2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En la presente investigación los resultados los interpretamos mediante estos indicadores, representados en tablas y gráficos.

**Tabla N° 1:** Cuadro de Variables e indicadores

VARIABLE	VARIABLE	INDICADORES
INDEPENDIENTE	<b>DEPENDIENTE</b>	
<b>Crio conservación de ovocitos</b>	Cantidad de ovocitos recuperados.	NÚMERO
	Estados de madurez de ovocitos.	NÚMERO
	Ovocitoscrioconservados.	NÚMERO
	Calidad de ovocitos pos descongelación.	PORCENTAJE

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** CALDERON, Diego

### **2.5.1. Unidad de estudio**

La unidad estudiada fue 16 ovarios de hembras caninas post- ovariectomía.

## **2.6. MANEJO DEL ENSAYO**

### **2.6.1. Procedimiento**

- Se colocó los ovocitos en 10ml de suero fisiológico se para poder transportarlos, con un tiempo estimado de (2 horas) y llevado en un terno transporte a 8°.
- Se realizó el lavado16 ovarios de los ovarios al llegar al laboratorio, con el objetivo de quitar las impurezas en las que viene inmersa el ovario como son: (meso ovario, meso salpiens. etc.)
- Se procedió a la colección de ovocitos por punción con jeringuillas de 10 ml y aguja calibre 22.
- Se colocó el contenido de la jeringuilla en una caja petri previamente con medio de mantenimiento donde se realizó la identificación y caracterización de los ovocitos en función de la maduras y la calidad.
- Se evaluó las características de calidad y madurez
- Se pasó a los ovocitos inmaduros y de calidad 1 a un medio de crio conservación 10 minutos y posterior el llenado de la pajilla.
- Se colocó a los ovocitos en un medio de mantenimiento durante 10 minutos.
- Se empaquetó a los ovocitos maduros de calidad 1 e inmaduros.
- Se sumergió los ovocitos en el medio de crio conservación.
- Se realizó el empaquetado que consiste en introducir el ovocito dentro de la pajilla con la misma técnica que se utiliza para el empaquetado de embriones; es decir suspendidos en el medio de congelación en la parte media de la pajuela y separada por dos burbujas de aire y posterior en medio de los extremos.
- Se colocó en la máquina de crio conservación previamente enfriado para esperar el tiempo necesario por el programa elegido hasta que descienda la temperatura a -30°C y posterior sumergimiento en nitrógeno líquido.
- Se situó la pajilla en agua temperada a 37°C y se espera 2 minutos.
- Se extrajo el contenido con la ayuda de una pistola universal y se colocó en una caja Petri.
- Se examinó las muestras en un estereoscopio para determinar las estructuras de los ovocitos y su viabilidad.

## CAPÍTULO III

### 3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este capítulo se presenta los resultados obtenidos durante la ejecución de la investigación realizada en el laboratorio de la biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

#### 3.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS

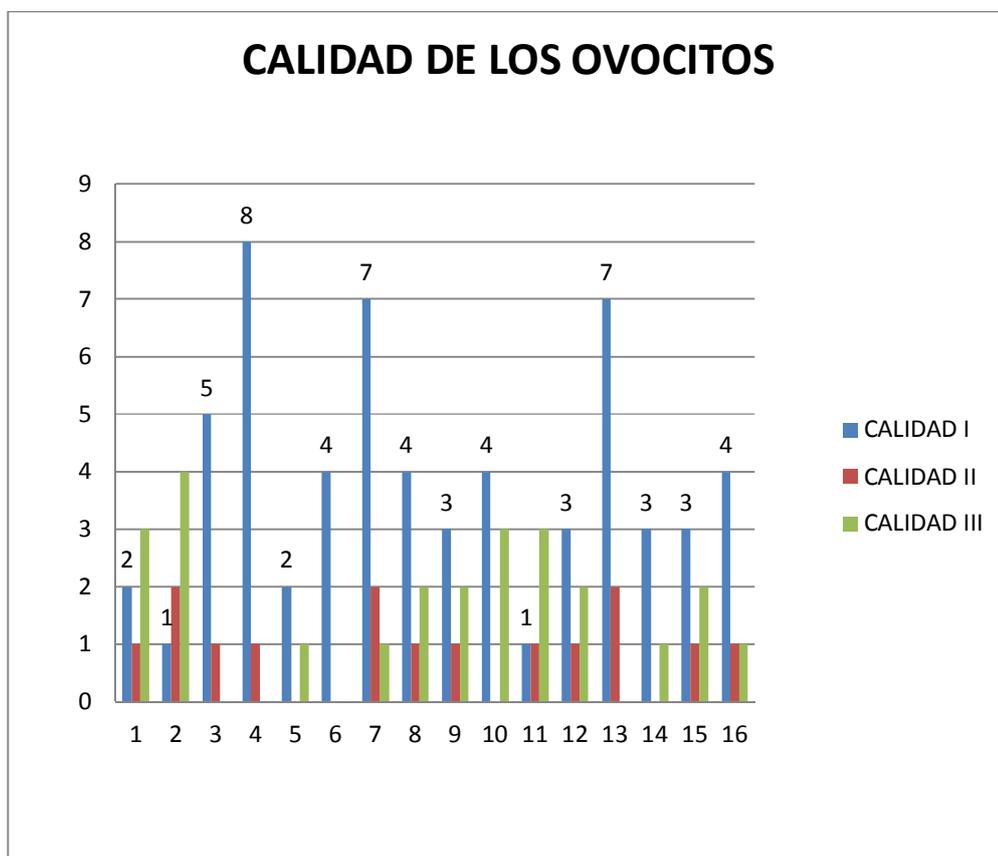
**Tabla N° 2:** Total de ovocitos caninos recuperados y clasificados según su calidad.

OVARIOS	OVOCITOS CALIDAD I	OVOCITOS CALIDAD II	OVOCITOS CALIDAD III
1	2	1	3
2	1	2	4
3	5	1	-
4	8	1	-
5	2	-	1
6	4	-	-
7	7	2	1
8	4	1	2
9	3	1	2

10	4	-	3
11	1	1	3
12	3	1	2
13	7	2	-
14	3	-	1
15	3	1	2
16	4	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>61</b>	<b>15</b>	<b>25</b>

**Fuente:** Directa.  
**Elaborado por:** CALDERÓN, Diego

**Gráfico 5:** Calidad de ovocitos.



**Fuente:** Directa.  
**Elaborado:** CALDERÓN, Diego

De los 16 ovarios en estudio se obtuvo 61 ovocitos de calidad I por estar rodeados por tres capas de células del cumulus con citoplasma homogéneo, 15 ovocitos de calidad II por estar rodeado con menos de tres capas de células del cumulus y citoplasma generalmente homogéneo y 25 ovocitos de calidad III por ser desnudos y su citoplasma con apariencia irregular con zonas oscuras.

**Tabla N° 3:**Ovocitos de calidad 1 maduros e inmaduros

OVARIOS	OVOCITOS CALIDAD I	OVOCITOS MADUROS	OVOCITOS INMADUROS
1	2	0	2
2	1	1	0
3	5	1	4
4	8	2	6
5	2	1	1
6	4	1	3
7	7	3	4
8	4	0	4
9	3	1	2
10	4	1	3
11	1	1	0
12	3	1	2
13	7	2	5
14	3	0	3
15	3	1	2
16	4	1	3
<b>TOTAL</b>	<b>61</b>	<b>17</b>	<b>44</b>

**Fuente:** Directa.

**Elaborado:** CALDERON, Diego.

Se muestra en el cuadro 3 la cantidad de ovocitos calidad 1 divididos en maduros e inmaduros por su estructura.

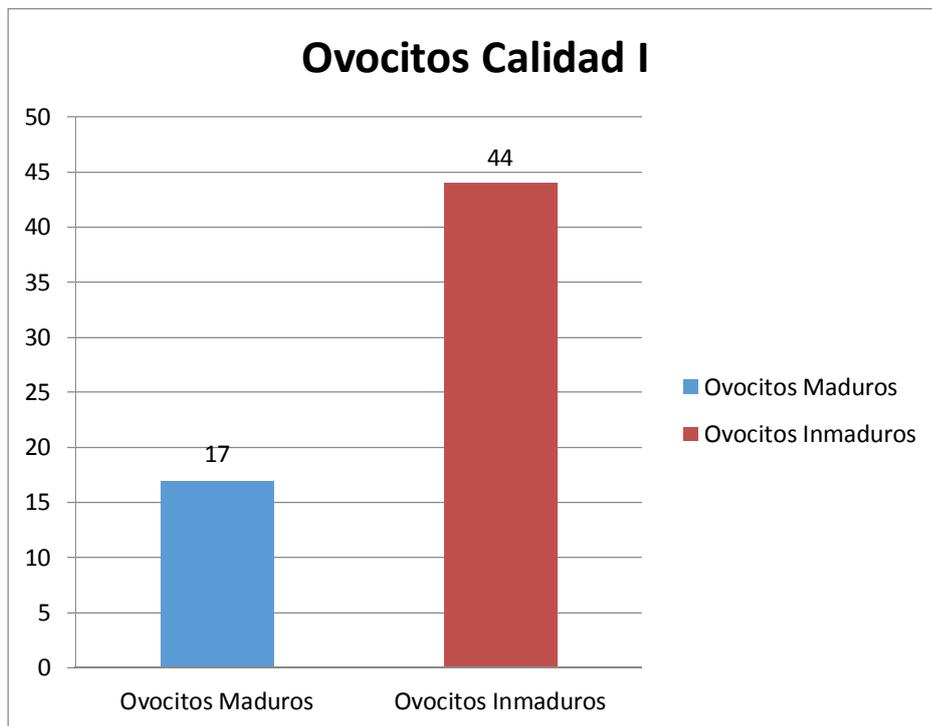
**Tabla N° 4:** Total de ovocitos calidad 1

	OVOCITOS CALIDAD I
Ovocitos Maduros	17
Ovocitos Inmaduros	44

**Fuente:** Directa.

**Elaborado:** CALDERON, Diego.

**Gráfico 6:** Ovocitos Calidad I



**Fuente:** Directa.

**Elaborado:** CALDERON, Diego.

De los datos obtenidos el total de ovocitos de calidad 1 que fue de 61 que representa el 100%, dividido en maduros que obtuvo el 72% ya que tienen una completa estructura e inmaduros con el 28% puesto que, su estructura morfológica aun no es apta para la reproducción por lo que se someterán al proceso de maduración y crio conservación.

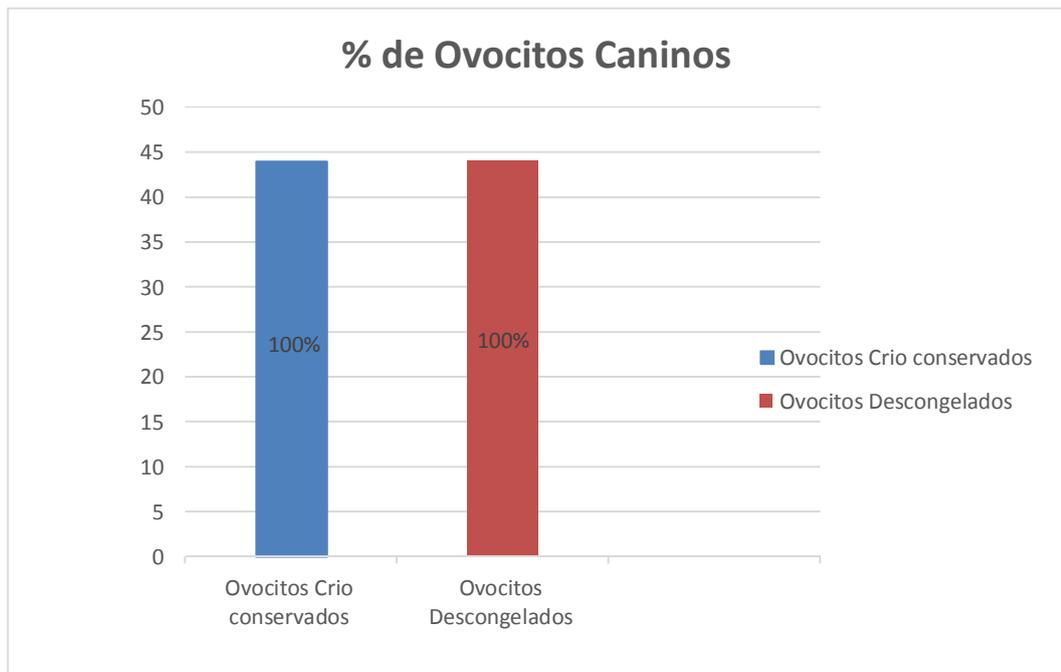
**Tabla N° 5:**Total de ovocitos de calidad I inmaduros y crio conservados

OVARIOS	OVOCITOS CALIDAD I E INMADUROS	OVOCITOS CRIO CONSERVADOS
1	1	1
2	0	0
3	3	3
4	1	1
5	1	1
6	2	2
7	3	3
8	2	2
9	2	2
10	3	3
11	0	0
12	2	2
13	4	4
14	2	2

15	2	2
16	3	3
<b>TOTAL</b>	<b>44</b>	<b>44</b>

**Fuente:** Directa.  
**Elaborado:** CALDERON, Diego.

**Gráfico N° 7:** Porcentaje de Ovocitos Caninos recuperados y crioconservados



**Fuente:** Directa.  
**Elaborado:** CALDERON, Diego.

De los datos obtenidos se refleja que la calidad de ovocitos inmaduros al someterse al proceso de crio conservación su viabilidad fue del 100%.lo que demuestra una alta resistencia del ovocito canino para este tipo de proceso (CRIOCONSERVACIÓN).

### **3.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

La producción “in vitro” de ovocitos según Palma (2008), considera que se ha convertido en un importante progreso biotecnológico así como es un aporte relevante para preservar las razas caninas, pese a que su sola aplicación no garantiza el éxito económico puesto que el proceso de crío conservación se alcanza con un conjunto de factores como inversión de capital, personal técnicamente capacitado, tomar las decisiones correctas en cuanto al tiempo en el cual se debe aplicar este proceso, potencial de comercialización de los productos obtenidos, análisis del mercado de ovocitos, entre otros.

Sin embargo según Gordon & Lu (2000), expresa que los ovocitos pueden permanecer en solución salina a temperatura de 30 a 37 grados C. durante 8 horas sin llegar a afectar su calidad para los procesos de maduración y fertilización in vitro, a partir de la investigación es posible que los ovocitos pueden permanecer 12 horas o más sin extraerlos de los ovarios (foliculos), a temperaturas de 30 a 37 grados C., puesto que, en el proceso ejecutado obtuvimos 44 ovocitos sometidos en crío conservación dándonos una viabilidad del 100% ya que los mismos reaccionaron positivamente al proceso.

Es de gran importancia que se realicen más investigaciones sobre la crío conservación de caninos puesto que, se encuentran más investigaciones en bovinos con la finalidad de ir mejorando las técnicas y medios de maduración ovocitaria para poder tener una gama más amplia de oportunidad de mejorar las características genéticas y la preservación de especies caninas.



## CONCLUSIONES

- De los 44 ovocitos recuperados de calidad 1 e inmaduros que representa el 100 % se lograron descongelar la misma cantidad, lo que demostró la viabilidad del ovocito canino y su gran resistencia. A la vez se ha confirmado que la presencia de las células del *cumulus* alrededor del ovocito durante la maduración, es esencial para el desarrollo del mismo, sugiriendo que las células del *cumulus* segregan factores solubles que mejoran el desarrollo de competencia del ovocito o remueven los factores que pueden inhibir o suprimir su futuro desarrollo (MAYES Y SIRARD, 2001). Además el método de “aspiración folicular” es el de mayor utilidad para conservar la estructura de los ovocitos sin causar algún daño como también en base a la investigación se refleja que el mejor crio conservante para la ejecución de este proceso es el “etilenglicol”.
- La técnica de aspiración folicular utilizada para la recolección de ovocitos provenientes de ovarios extraídos, mediante ovario histerectomía, nos proporcionó resultados eficientes en comparación a otras especies en las cuales el porcentaje fue bajo. a través de estas técnicas se puede obtener lo siguiente: evaluación eficiente de la capacidad fertilizante de espermatozoides y ovocitos, difusión del uso de semen valioso y escaso, prolongación de la vida reproductiva de animales genéticamente valiosos, inmaduros o muy viejos, disminución, en cierta manera, de los costos de la aplicación de la transferencia de embriones, al hacer uso de una fuente económica e inagotable de ovocitos, facilitación de la importación y exportación de material genético proveniente de hembras de alto valor genético; desarrollo de las condiciones adecuadas para implementar otras técnicas reproductivas en el campo de la micromanipulación de embriones; creación de bancos de gametos provenientes de animales seleccionados por excelencia productiva y/o adaptabilidad.

- Se pudo observar que los ovocitos post- descongelación se encontraron con sus estructuras intactas, manteniendo la misma calidad que presentaron antes de someterlos al proceso de crioconservación, por lo tanto el protocolo y los equipos del laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de esta universidad fueron eficientes.

## RECOMENDACIONES

- Se debe seguir realizando investigaciones sobre el tema de crioconservación de ovocitos caninos ya que, esto ayudara a preservar el material genético y mejorar la especie para la producción se recomienda la utilización del método de aspiración folicular y el uso del crio conservante etilenglicol.
- A partir de los resultados del presente trabajo investigativo se recomienda estandarizar y validar las técnicas de fertilización y producción de embriones, a partir de ovocitos recolectados de la especie canina, con la finalidad de incorporar una herramienta confiable para aumentar la producción, selección y comercialización de embriones caninos, con el objeto de contribuir al progreso de la transferencia de embriones y utilizar esta metodología como base para el desarrollo de otras biotecnologías.
- Por los resultados obtenidos en esta investigación se recomienda seguir utilizando los equipos de crio conservación ya que, demuestran la factibilidad del desarrollo mejorar los avances en el estudio de la preservación de razas poco comunes en el Ecuador.

## BIBLIOGRAFÍA

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOGGI, JC; 2002. Vitricación y congelación convencional de embriones ovinos. Comparación de ambos métodos según sobrevivencia y desarrollo in vitro. Tesis de Magister, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Chile.
- CABODEVILA J, M TEREMUEL; 2001. Crio preservación de embriones bovinos. En: Palma A. Biotecnología de la reproducción. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- CALDERON, Alanís; 1988. Fundamentos sobre urología clínica en perros y gatos; UNAM; México, 1988; ISBN 949634408-002.
- CELESTINOS, C; 2003. Evaluación de la sobrevivencia in vitro de embriones de coneja bipartidos antes y después de la vitricación. Tesis de Magister, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Chile.
- CUNNINGHAM, James; 2007. Fisiología Veterinaria; 2003 Tercera Edición España; ISBN 848174692.
- DERIVAUX, J; 1961. Fisiología de la Reproducción e Inseminación de los Animales Domésticos; Edición Zaragoza-España.
- FELMAN Y NELSON; Endocrinología y Reproducción Canina y Felina.
- GORDON, I; 1994. Store and cryopreservation of oocytes and embryos. En: Laboratory Production of Cattle Embryos, Gordon I (ed), editores CAB INTERNATIONAL, Wallingford.
- GRANJA, Verónica; 2010; Fecundación ganado Vacuno, tesis; Quito.
- HERNANDEZ, Verónica; 2010 Embriología. USA103:11987-11992
- ILERA, Miguel; 2006; Fisiología Reproductiva; Barcelona; ISBN 795671922-X
- JARAMILLO, Juan; 2008. Manual del Auxiliar del Laboratorio, Según Edición, Editorial MAD.SL

JONES, E.D y Joshua; J.O. 1984: Problemas Clínicos de la Reproducción Canina. Ed. El manual moderno. México D.F. 1984.

KRUIP, 2000. Morfología de ovocitos inmaduros en bovinos.

LANGFORD, Michael 2005. Manual de Laboratorio Fotográfico, Gran Bretaña Segunda Edición

ORTEGA, Antonio. Ginecología y Obstetricia Canina, UADY, 2015.

PALMA, G; 2001. Evaluación morfológica de los embriones bovinos. En: Biotecnología de la Reproducción, Palma (ed). Ediciones INTA. Balcarce. Argentina.

RECOSTI, Antonio, 2007. Fisiología en Animales Domésticos; Quito Ecuador-Tesis.

SANDOVAL, Elsa Margarita; 2007. Inseminación Artificial Intravaginal en Caninos con semen congelado; tesis Quito-Ecuador.

SEQUERA, Johana; 2003. Procesos reproductivos de bovino; Argentina, ISBN 8496344088.

VILLA, María 2007; Manual de Prácticas química General, Segunda Edición, Medellín Colombia

WANKE, M. Magdalena; 2006. Reproducción en caninos y felinos, Edición Española, ISBN 950555298-X

WILDT, D;W PANKO; P CHAKRABORTY, S SEAGER; 1979.Relationship of serum estrone, estradiol and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch.BiolReprod.

## **REFERENCIAS VIRTUALES**

CABREJOSSOLANO, Karina; Sistema Reproductor Femenino, consultado el 15-12-2014; <http://es.scribd.com/doc/58897924/Trompas-de-Falopio-oviductos>.

CERVATES, Juli; anatomía y Fisiología Aparato Reproductor; Consultado el 18-12-2014; <http://ebookbrowse.com/anatomia-y-fisiologia-aparato-reproductor-pdf-d419972809>.

CORDOVA, A; Anatomía y Fisiología del Aparato Reproductor Masculino y femenino. FisiologíaDinámica. Editorial Masson. 2003Barcelona. Consultado 10-12-2014.

[Http://www.monografias.com/trabajos-pdf-/anatomia-fisiologia-aparato-ascalino-femenino/anatomia.fisiologia-aparato-masculino-femenino.pdf](http://www.monografias.com/trabajos-pdf-/anatomia-fisiologia-aparato-ascalino-femenino/anatomia.fisiologia-aparato-masculino-femenino.pdf)

Crianza canina; 2013 Derechos Reservados, Consultado el 20-12-2014.

[Http://www.crianzacanina.com/articulo.asp?Id=546.](http://www.crianzacanina.com/articulo.asp?Id=546)

DE LOS REYES, Mónica; Maduración nuclear y citoplasmática in vitro en ovocitos de perra 2011 ISSN: 2223-9375; CONSULTADO EL 18-01-2015

[Http://www.reproduccionanimal.org/site3/files/revistas/spermova/MADURACION-NUCLEAR-Y-CITOPLASMATICA-IN-VITRO-EN-OVOCITOS-DE-PERRA.pdf](http://www.reproduccionanimal.org/site3/files/revistas/spermova/MADURACION-NUCLEAR-Y-CITOPLASMATICA-IN-VITRO-EN-OVOCITOS-DE-PERRA.pdf)

ESQUIVEL, Carla; Sistema Reproductor 1987; Consultado el 20-01-2015

[Http://www.uv.mx/vracruz/fmvz/files/2013/04/Aatomía-del-aparato-genital-de-perros-y-gatos.pdf](http://www.uv.mx/vracruz/fmvz/files/2013/04/Aatomía-del-aparato-genital-de-perros-y-gatos.pdf)

Laboratorio, Trifarma S.A; 2012 Av. Santa Rosa n° 390, Urb. Aurora-Atelima-Peru;Para MEDIFARMA S.A; Jr. Ecuador 787; Consultado 12-02-2015

[Http://es.wikipedia.org/wiki/suero\\_fisio%c3b3gico](http://es.wikipedia.org/wiki/suero_fisio%c3b3gico)

MARTINEZ, B y E; 2011. Fecundación “Invitro” en los animales granja <http://books.google.com.ec/books?id=IsL9chhovssC&pg=PA10&lpg=PA10&dq=fecundacion+in+vitro+perros&source=bl&ots=T2erOsAHfR&sig>

RATTO M ;Desarrollo de embriones de bovino obtenidos por fecundación in vitro cultivados con células oviductales o medio condicionado y transferidos a hembras receptoras ISSN 0301-732X; Consultado 25-03-2015

[Http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/34264/1/mesaortiz.pdf](http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/34264/1/mesaortiz.pdf)

SANCHEZ, Alfonso, Leonardo López Zambrano, Mauricio Silva Jimenez y Marco Berland Olea; Rev. Cient. (Maracaibo) v.16 n.2.Mracaibo mar. 2006; versión impresa ISS 0798-2259; Consultado el 04-03-2015

[Http://www.scielo.org.ve/scielo.php?Pid=s0798-22592006000200005&script=sci](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?Pid=s0798-22592006000200005&script=sci)

SANCHEZ; Evaluación de respuesta ovárica y calidad de ovocitos en gatas tratadas con hormona foliculoestimulante(FSH) utilizando dos esquemas de administración; versión impresa ISSN 0301-732X; 23.04.2003; Consultado el 20-03-2015

[Http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X200300100014](http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X200300100014)

VALERA, Miguel Ángel; Reproducción en Perros; Año 2008; Policlínica Veterinaria Centauro; Avda. Derechos Humanos; Consultado el 21-03-2015

VILLAVICENCIO, José; [www.scyelo/archivodemedicinaveterinaria](http://www.scyelo.org/archivodemedicinaveterinaria). Consultado 14-04-2015;

VILLALOBOS, Vanny; [www.academia.edu/3684429/Gametogenesis](http://www.academia.edu/3684429/Gametogenesis). Consultado 14-06-2015

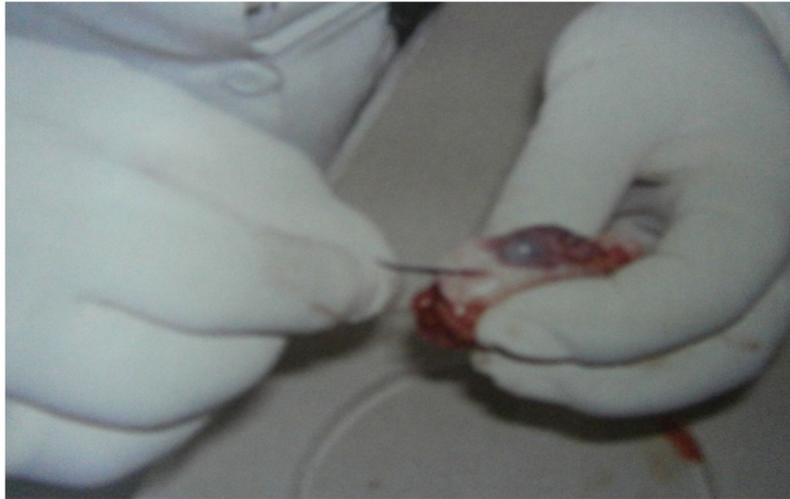
HORNED; 2005; Consultado el 01-04-2015

[Http://APARATO-REPRODUCTOR+DE+LA+PERRA&CLIENT=FIREFOX-A&hs=yqv&rls=org.mozilla](http://APARATO-REPRODUCTOR+DE+LA+PERRA&CLIENT=FIREFOX-A&hs=yqv&rls=org.mozilla)

[Tarwi.lamolina.edu.pe/emellisho/Reproducción\\_archivos/Practica%202-eval-ovocitos.pdf](http://Tarwi.lamolina.edu.pe/emellisho/Reproducción_archivos/Practica%202-eval-ovocitos.pdf)

## ANEXOS

1.- Limpieza del ovario canino para desprenderlo de estructuras anexas

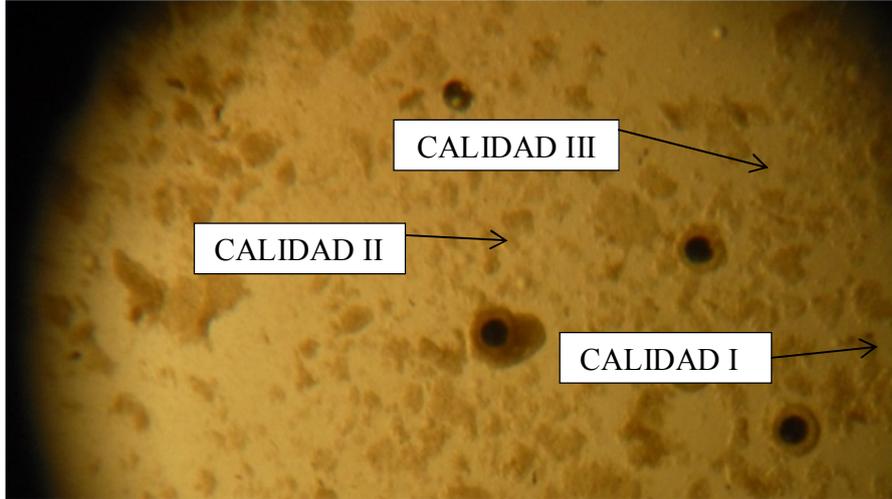


2.- Búsqueda de ovocitos en el estereoscopio.

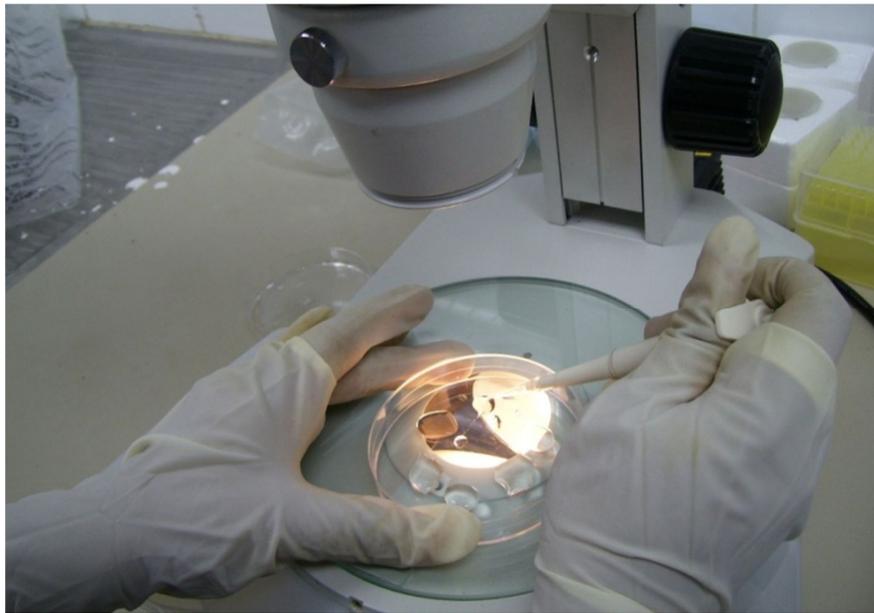




3.- Ovocitos de calidad uno que se utilizaran para el proceso de crioconservación.



4. Recolectando los Ovocitos maduros de calidad 1.



5. Holding que contiene los Ovocitos maduros de calidad 1.



6. Equipo utilizado para la crio conservación

