

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

**Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos
Naturales**



Carrera de Medicina Veterinaria

TEMA: *EVALUACION DE LA CRIOCONSERVACION DE
OVOCITOS EN BOVINO HEMBRA (BOSS TAURUS) EN LA UA-
CAREN EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA
REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI.*

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

AUTOR:

Christian Anibal Gutiérrez Cumbajin.

DIRECTOR DE TESIS

MVZ. Cristian Neptalí Arcos Alvarez.Mg

LATACUNGA – ECUADOR

2015

AUTORÍA

YO, Gutiérrez Cumbajin Christian Aníbal, portador de la Cédula de Identidad N° 172317778-6, libre y voluntariamente declara que la tesis titulada, ***“EVALUACION DE LA CRIOCONSERVACION DE OVOCITOS EN BOVINO HEMBRA (BOSS TAURUS) EN LA UA-CAREN EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECCIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI.”***, es original, auténtica y personal. En tal virtud declara que el contenido será de exclusiva responsabilidad del autor legal y académico, autoriza la reproducción total y parcial siempre y cuando se les cite al autor del presente documento.

Gutiérrez Cumbajin Christian Aníbal

172317778-6

AUTOR

AVAL DEL DIRECTOR

En calidad de director de tesis de grado titulada ***“EVALUACION DE LA CRIOCONCERVACION DE OVOCITOS EN BOVINO HEMBRA (BOSS TAURUS) EN LA UA-CAREN EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI..”*** presentada por el estudiante Gutiérrez Cumbajin Christian Anibal portador de la Cédula de Identidad N° 172317778-6 como requisito a la obtención del grado 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 defensa de tesis.

MVZ. Cristian Neptalí Arcos Alvarez.Mg

Director de tesis

AVAL MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Cumpliendo con el Reglamento del Curso Profesional de la Universidad Técnica de Cotopaxi, en calidad de Miembros de tribunal de la Tesis con el Tema: ***“EVALUACION DE LA CRIOCONCERVACION DE OVOCITOS EN BOVINO HEMBRA (BOSS TAURUS) EN LA UA-CAREN EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI..”*** propuesto por el egresado Gutiérrez Cumbajin Christian Anibal , presentamos el **Aval Correspondiente** al presente trabajo, certificando que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones del presente documento.

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

Aprobado por:

Dra. Blanca Mercedes Toro Molina.Msc

PRESIDENTE

MVZ. Blanca Jeaneth Villavicencio Villavicencio.Mg

OPOSITOR

MVZ. Paola Jael Lascano Armas.Mg

MIEMBRO

DEDICATORIA.

A mis docentes, que aportaron con sus conocimientos, enseñanzas y experiencias especialmente al MVZ. Cristian Arcos, por su apoyo como Director de Tesis, pues me enseñó las pautas y brindó sus consejos durante la realización de este trabajo.

A mi familia especialmente a mis padres Anibal y Ana, que gracias a su apoyo económico y moral pude culminar con mis estudios universitarios con éxito.

A mis hermanos David y Paulina, por su apoyo y cariño, por compartir a mi lado lo bueno y malo que la vida nos ha dado.

Con mucho cariño para todos.

Christian Anibal Gutiérrez Cumbajin.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Cotopaxi, a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por permitirme estudiar en sus aulas y ver cristalizar mi sueño.

A los Señores (as) docentes de la UA- CAREN, por su dedicación en la noble labor de educar a los estudiantes.

Al Dr. Cristian Arcos, por su invaluable contribución para la realización del presente trabajo en calidad de director de tesis.

A los docentes Dra. Mercedes Toro, MVZ. Blanca Villavicencio y MVZ. Paola Lascano; por su importante colaboración, aporte en la supervisión y calificación del presente estudio.

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".

Christian Anibal Gutiérrez Cumbajin.

PRELIMINARES

Portada

Autoría.....	ii
Aval del director.....	iii
Aval de los miembros de tribunal.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Declaración expresa.....	vii
Índice de contenido.....	ix
Índice de figuras.....	xiii
Índice de cuadros.....	xiv
Índice de gráficos.....	xv
Índice de anexos.....	xvi
Índice de fotos.....	xvii
Resumen.....	xviii
Abstract.....	xix
Aval de traducción.....	xx
Introducción.....	xxi

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	16
ABSTRAC.....	17
AVAL DE TRADUCCIÓN.....	18
INTRODUCCIÓN.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	20
HIPÓTESIS.....	20
CAPÍTULO 1.....	21
1.2. ÓRGANOS DE LA VACA.....	22
1.3. REPRODUCCIÓN.....	24
1.3.1. CICLO REPRODUCTOR DE LA VACA.....	26
1.1 CICLO ESTRAL.....	27
1.4.2. ESTRO.....	28
1.5. DINÁMICA FOLICULAR.....	29
1.5.1. FOLICULOGENESIS.....	31
1.5.2. OVOGÉNESIS.....	34
1.6. ETAPAS DE LA OVOGÉNESIS.....	35
1.7. ESTRUCTURA DEL OVULO.....	35
1.8. CRIO CONSERVACIÓN DE OVOCITOS.....	37
1.8.1. FUNDAMENTOS DE LA CRIO PRESERVACIÓN.....	38
1.8.1. AGENTES CRIOPROTECTORES.....	41
1.8.3. CRIO PROTECTORES PENETRANTES.....	41

1.9. MÉTODOS DE CRIO PRESERVACIÓN.....	44
CAPITULO II.....	49
2.1.. CARACTERISTICAS DEL LUGAR EXPERIMENTAL.....	50
2.2. RECURSOS.....	51
2.3.4. MATERIAL BIOLÓGICO.....	53
2.6. MANEJO DEL ENSAYO.....	55
2.6.3. OBTENCIÓN DE LOS EJEMPLARES.....	57
2.7.2. CRIO PRESERVACIÓN DE OVOCITOS.....	59
CAPITULO III.....	61
3.1. RESULTADOS.....	61
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N.1 corte trasversal del ovario de la vaca (óvulos).....24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N.- 1. Clasificación taxonómica del bovino.....	22
Cuadro N.- 2. Sistema Hipotálamo – Hipófisis gonadal.....	25

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico N.- 1. Resultados generales	63
Grafico N.-2. Evaluación de la calidad de los ovocitos.....	65
Grafico N.- 3. Selección de la madurez de los ovocitos de calidad 1....	67
Grafico N.-4. Análisis general y post descongelación.....	69
Grafico N.- 5. Viables y dañados.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N.- 1. Resultados generales	61
Tabla N.-2. Evaluación de la calidad de los ovocitos.....	64
Tabla N.- 3. Selección de la madurez de los ovocitos de calidad 1.....	66
Tabla N.-4. Análisis general y post descongelación.....	68

ÍNDICE DE ANEXOS

1.- Limpieza del ovario para desprenderlo de estructuras anexas.....	77
2.- colocación de contenido folicular en tubos de ensayo.....	78
5. Recolectando los ovocitos maduros de calidad 1.....	81
6. Visita del miembro opositor del tribunal.....	83

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi con la finalidad de evaluar la crio conservación de ovocitos de bovino (boss Taurus) post congelación; este tipo de técnica de crio conservación de ovocitos es usada como herramienta biotecnológica para lograr el mejoramiento genético de diferentes razas y mejorar la producción mediante la reproducción asistida.

Los ovocitos recolectados son de 20 vacas; que estuvieron destinadas al faenamiento en el camal de Saquisilí, previa selección por sus características fenotípicas. Los ovocitos fueron extraídos post faenamiento teniendo en consideración que deben ser transportados rápidamente al laboratorio para mantener su viabilidad.

Una vez extraídos fueron colocados en suero fisiológico, fueron lavados para quitar las impurezas, entonces se realiza la colección de ovocitos por punción con jeringuillas de 10 ml. con aguja calibre 22, en el medio holding se realizara la identificación y caracterización de los ovocitos en función de la madures y la calidad, se colocara a los ovocitos en un medio de mantenimiento como el etilenglicol durante 10 minutos, se empaquetara los ovocitos de calidad 1. Y de madures 1 en una 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, luego se colocara en la máquina de crio conservación previamente enfriado para esperar el tiempo necesario por el programa elegido, en este caso curva 3. Hasta que descienda la temperatura a -30°C y posterior sumergimiento en el tanque de nitrógeno líquido. Se descongelo con la técnica de pajillas de semen, para posteriormente colocar en una caja Petri y evaluar su calidad y madures posdescongelamiento en el estéreo microscopio. En el cual hubo un ligero daño o cambio de calidad.

ABSTRAC

This research was conducted at the **Laboratory of Reproductive Biotechnology at the Technical University of Cotopaxi** in order to assess the cryo preservation of bovine oocytes (*Taurus boss*) after freezing; This type of conservation technique of cryo oocyte is used as biotechnological tool for breeding of different breeds and improve production through assisted reproduction.

The collected oocytes are 20 cows; they were intended to slaughter in the slaughterhouse Saquisilí, preselection for their phenotypic characteristics. The oocytes were removed after slaughter taking into consideration that must be transported quickly to the laboratory to maintain its viability.

Once extracted were placed in physiological saline, were then washed to remove impurities, after oocyte collection puncture is performed with 10 ml syringes. And 22 gauge needle, the follicular fluid in the identification and characterization of the oocyte depending on the maturity and quality was made, the oocytes were placed in maintenance medium for 10 minutes oocyte, oocyte quality is packaged 2 and 3. And of maturity 1 and 2. To further make the submergence of oocytes in the middle of cryo conservation after packaging of introducing the oocyte within the straw with the same technique used for packaging it will be made embryos; namely; suspended in the freezing medium in the middle of the straw and separated by two air bubbles in the middle and back end, then placed in cryo preservation machine precooled to wait long enough for the chosen program.

Until the temperature drops to -30°C and subsequent immersion in liquid nitrogen.

The purpose of this experiment is to evaluate if the thawing oocytes are viable or not, this was done at the Laboratory of Reproductive Biotechnology at the Technical University of Cotopaxi.

AVAL DE TRADUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la posibilidad de crio-conservar ovocitos a dado nuevas oportunidades de preservar mediante el material genético características fenotípicas y genotípicas provechosas, para luego implantarles de forma adecuadas en el hato, de esa forma se a logrado evolucionar a los animales y su producción a nivel mundial.

En lo que se refiere a bovinos el Ecuador cuenta con una población de 4,5 millones de cabezas bovinas debido al avance tecnológico en lo que es la producción de leche, se torna como prioridad trabajar en mejoramiento genético, nutrición, sanidad y manejo, especialmente en las comunidades campesinas, ya que constituyen para éstas su fuente de alimentación y adicionalmente sustento económico para su familia lo que a llevado a buscar alternativas para mejorar la productividad de los animales, siendo una de estas la crio conservación de ovocitos.(10).

En la localidad de Latacunga actualmente muy pocas ganaderías han logrado el mejoramiento genético y de producción mediante la utilización

de biotecnología; esta práctica facilitaría ese objetivo en menor tiempo y con menor costo.(8).

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar de la crio conservación de ovocitos en bovinos hembra (boss taurus) en la UA-CAREN en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

OBJETIVOS ESPECÍFICO

- Evaluar la calidad de los ovocitos en función de las características morfológicas presentes en los mismos mediante microscopia.
- Determinar la madures de los ovocitos por las características morfológicas mediante microscopia.
- Evaluar las características de calidad y madures de los ovocitos luego de la descongelación.

HIPÓTESIS

- **H0.-** La técnica de crio conservación de ovocitos no afecta la calidad post congelación de los mismos.

- **H1** La técnica de crio conservación de ovocitos si afecta la calidad post congelación de los mismos.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En este capítulo se describe las características anatómo-fisiológicas de la vaca (*Bos taurus*) a la vez se profundiza la crio conservación de células; especialmente ovocitos y las técnicas a utilizarse.

1.1.- La vaca.

Según el Méd. Vet. Horacio R. Zeballos; El *Bos taurus* incluye aquellos vacunos domesticados comunes en las zonas templadas, y a su vez, parece proceder de una mezcla de los descendientes del Uro (*Bos primigenius*) y del Celtic Shorthorn (*Bos longifrons*). Se cree que la mayoría de los bovinos, descienden principalmente del robusto Uro (también denominado “Ur” o “Urú”). Este era el poderoso toro salvaje que cazaban nuestros antepasados. Además de los uros, hay otro progenitor de algunas de nuestras modernas razas, y la primera raza doméstica que se conoce: el Celtic Shorthorn o Toro Céltico; el cual era de tamaño menor que el uro y tenía un perfil cóncavo. (1).

Los animales precoces, con buen crecimiento y desarrollo, que quedan preñados a los 14-15 meses y tienen su parto alrededor de los 24 meses de edad, comenzaran a producir leche temprano y tendrán una mejor vida productiva, estos hechos demuestra que esta vaquilla posee una alta capacidad productiva y por lo tanto una buena eficiencia económica.(2).

CUADRO N° 1.- Clasificación taxonómica del bovino Hembra.

Nombre común	Vaca doméstica
Reino	Animal (Animalia)
Phylum	Cordados (Chordata)
Subphylum	Vertebrados (Vertebrata)
Nombre científico (género y especie)	<i>Bos taurus</i>
Clase	Mamíferos (Mammalia)
Suborden	Artiodáctilos (Artiodactyla)
Familia	Bóvidos (Bovidae)

Fuente.- Bavera, G. A. 2005 (3).

1.2.- Órganos sexuales femeninos de la vaca.

Demos una mirada a las partes que componen el aparato reproductor bovino. Hay dos Ovarios, dos Oviductos, dos Cuernos Uterinos, un Útero, la Cérvix, la Vagina y la Vulva. La Vejiga está ubicada debajo del aparato reproductor está conectada a la apertura uretral en la base de la Vagina. El Recto está ubicado encima del aparato reproductor (4).

Los Labios de la Vulva están ubicados a los lados de la apertura vulvar, y tienen aspecto seco y arrugado cuando la vaca no está en celo. En la medida que el animal se acerque al celo, la Vulva empezará a hincharse y tomará una apariencia rojiza y húmeda. .(6).

La Vagina, que tiene como seis pulgadas de largo, se extiende desde la apertura uretral hasta la Cérvix. Durante la monta natural, el semen es depositado en la porción anterior de la Vagina. La Vagina también sirve como parte del canal de parto al momento del parto. .(7).

La Cérvix es un órgano de paredes gruesas, que establece la conexión entre la Vagina y el Útero. Está compuesto de tejido conectivo denso y músculos, y será nuestra referencia al inseminar una vaca.(8)

La entrada a la Cérvix está proyectada hacia la Vulva en forma de cono. Esto forma un círculo ciego de 360° que rodea completamente la entrada a la cérvix. Esta base ciega del cono es conocida como Fornix.(7).

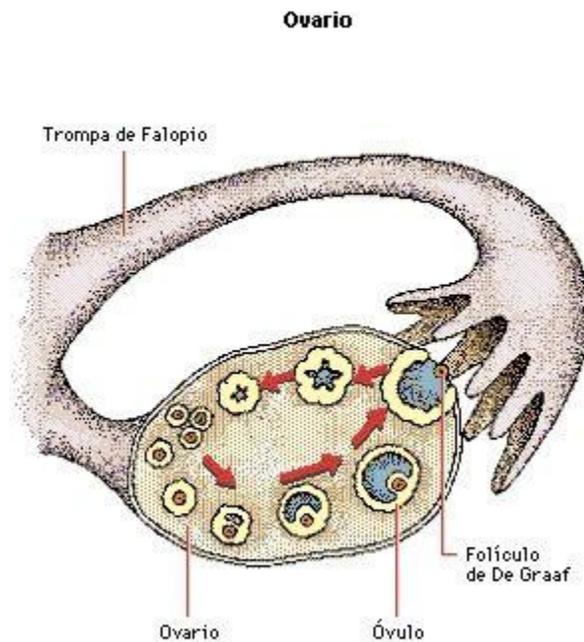
El interior de la Cérvix contiene tres o cuatro Anillos, a veces llamados pliegues. Este diseño le facilita a la Cérvix ejercer su función principal, que es la de proteger el Útero del medio ambiente exterior.(9).

A partir del Cuerpo Uterino, el tracto reproductor se divide y todos los órganos vienen en pares. Los dos Cuernos Uterinos están formados por

tres capas musculares, cada red de vasos sanguíneos. La función principal del Útero es proveer el ambiente óptimo para el desarrollo fetal.(10).

Cuando una hembra es servida, ya sea por monta natural o por inseminación artificial, los músculos uterinos, bajo la influencia de las hormonas Estrógeno y Oxitocina, se contraen rítmicamente para ayudar en el transporte de espermatozoides hacia el Oviducto (10).

FIGURA Nº 1.- Corte transversal del ovario de la vaca (óvulos).



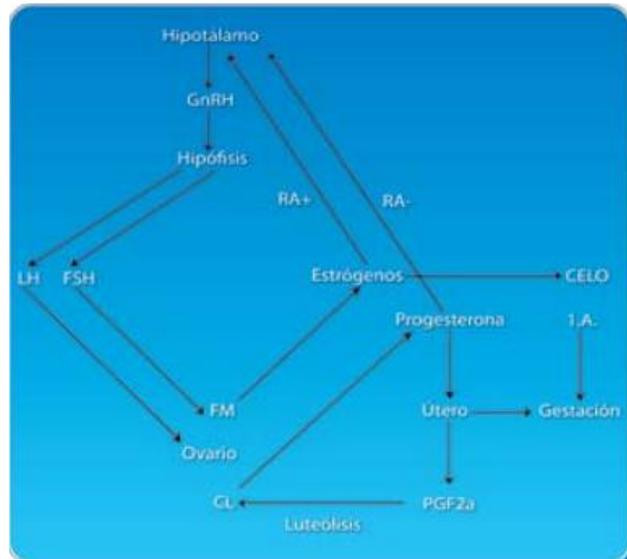
Fuente: Thomas.J, P. G. 2000.. *El aparato reproductor* (5).

1.3.- Reproducción.

La regulación de la actividad sexual se desarrolla en el organismo por el Sistema Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal. La interrelación entre estos componentes se realiza a través de la vía neurohormonal, donde la mayor importancia se encuentra en el proceso hormonal. Los mecanismos y procesos que regulan la actividad sexual de la vaca no están completamente aclarados, sin embargo, los resultados obtenidos de los trabajos de investigación en endocrinología, morfología, histología y clínica, brindan una valiosa información que nos permite tener una idea más clara sobre el dinamismo y mecanismo de los procesos de regulación del ciclo estral.(12).

Las hormonas son sustancias químicas catalizadoras, producidas en una glándula de secreción interna, con actividad en receptores específicos especializados, que son sintetizadas por glándulas endocrinas y vertidas directamente a la sangre para ejercer su actividad en órganos donde regula o coordina funciones corporales denominado **Organo Efector u Organo Blanco**.La mayoría de las hormonas regulan su propia tasa de secreción mediante un sistema de retroalimentación. (13).

CUADRO N° 2.- Sistema Hipotálamo -Hipófisis Gonadal.



Fuente. .- webveterinaria.com/virbac(2012). (12).

1.3.1.- CICLO REPRODUCTOR DE LA VACA.

Consiste en una serie de eventos reproductivos predecibles que comienzan en el estro y terminan en el estro siguiente. Se continúan a lo largo de la vida adulta y son interrumpidos por la gestación, lactancia, nutrición inadecuada o cuando las condiciones ambientales son estresantes. Condiciones patológicas del tracto reproductivo como infecciones uterinas y momificación fetal también pueden causar anestro, período en el cual la ciclicidad se ve interrumpida. (14).

IMPORTANCIA

La reproducción es una función de lujo. es el punto de partida de la producción y de fundamental importancia para la reproducción. El conocimiento del ciclo estral y sus diferentes fases, permite al veterinario realizar una evaluación del "status" reproductivo y productivo y del sistema en general. Es de fundamental importancia el conocimiento del ciclo estral para la evaluación reproductiva y en la regulación artificial o natural del ciclo sexual. (Ej. Sincronización de celo: prostaglandina). (15).

PUBERTAD

Momento en que las gónadas femeninas (hembras) y masculinas (machos) son capaces de liberar gametos (óvulos y espermatozoides), acompañado esto con la síntesis de hormonas, lo que lleva a los animales a tener secuencias completas de manifestación sexual. Momento en el cual ocurre la primera ovulación. (16).

1.4.- EL CICLO ESTRAL SE PUEDE DIVIDIR EN 4 ETAPAS

PROESTRO, ESTRO, METAESTRO Y DIESTRO. Cada una de éstas etapas es una subdivisión de la fase folicular y luteal del ciclo. La fase folicular incluye proestro y estro mientras que la fase luteal incluye metaestro y diestro. (5).

PROESTRO= formación de folículos ovulatorios + secreción de estrógenos

ESTRO = receptividad sexual + aumento de la secreción de estrógenos

METAESTRO = formación de cl + comienzo de secreción de p4.

DIESTRO = secreción sostenida de progesterona (6).

PROESTRO.

Es el período inmediatamente precedente al estro. Comienza cuando la progesterona desciende sus niveles como resultado de la luteólisis. Dura 3 días y es el período de mayor transición endócrina, de un período de dominancia de progesterona a un período de dominancia de estrógenos. Las gonadotrofinas FSH y LH son las principales responsables de ésta transición. Es durante ésta etapa que los folículos son reclutados para la ovulación y el tracto reproductivo de la hembra se prepara para la cópula. (9).

1.4.1 .- ESTRO:

Es el período durante el cual la hembra acepta la cópula. Es el momento más reconocible del ciclo estral porque se caracteriza por un comportamiento visible, signos como ser receptividad sexual y encuentro de las parejas sexuales. El estrógeno es la hormona dominante durante ésta etapa. No solo induce alteraciones comportamentales sino que también causa cambios en el tracto reproductivo. (11).

METAESTRO:

Es el período de transición de la dominancia de estrógenos a la de progesterona. Está entre la ovulación y la formación del CL funcional. Durante las primeras etapas del Metaestro, el estrógeno y la progesterona son relativamente bajas(16).

El nuevo folículo ovulado sufre remodelación celular y estructural para la formación de una glándula intra ovárica llamada CL. Ésta transición celular es llamada luteinización. Durante el metaestro la progesterona secretada es detectada tempranamente después de la ovulación. Sin embargo se requiere 2 a 5 días después de la ovulación para que el CL produzca cantidades suficientes de progesterona. (16).

DIESTRO:

Es el período de máxima función luteal. El Diestro es la etapa más larga de ciclo estral y el período de tiempo en que al CL es totalmente funcional y la secreción de progesterona es alta.(11)

Ésta termina cuando el CL es destruido (luteólisis). Altos niveles de progesterona preparan el útero para un temprano desarrollo embrionario y eventual implantación. La duración del Diestro está relacionada con la duración de tiempo que permanezca el CL funcional. . (13).

1.5.- DINÁMICA FOLICULAR OVÁRICA .

Una onda de crecimiento folicular involucra el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos individualmente identificables a partir de un diámetro de 4 mm, que ocurre al mismo tiempo en los dos ovarios. (17).

Durante aproximadamente 2 a 3 días todos los folículos crecen y uno de ellos es seleccionado, continúa creciendo y se convierte en folículo dominante, mientras que el resto de los folículos, llamado subordinados, se vuelven atrésicos y regresan. El folículo dominante, de la primera onda será anovulatorio, porque se desarrolla durante la fase luteal y tiene una fase de crecimiento (día 0 a 6), una fase aparentemente estática (días 6 al 12) y una fase de regresión (día 12 en adelante).(18).

Los folículos subordinados en cada onda incrementan su tamaño, pudiendo el mayor de ellos alcanzar un diámetro de 8 mm tres días después de la emergencia de la onda, y luego tienen una pequeña fase estática y regresa. (19).

Independientemente del patrón del desarrollo folicular del ciclo, la primera onda de desarrollo folicular se detecta el día de la ovulación. La segunda onda comenzará el día 9 ó 10 para los ciclos de 2 ondas y el día 8 ó 9 para los ciclos de 3 ondas. En éstos últimos, la tercer onda emerge en el día 15 ó 16 .Además existe una gran variabilidad individual en cuanto al día de emergencia en la segunda onda que puede comenzar entre los días 6 a 12. (20).

La duración del ciclo estral de la vaca depende principalmente de su patrón de desarrollo folicular para ser de 18 a 20 días (2 ondas) o de 21 a 23 días (3 ondas). En ambos casos, el folículo dominante en el momento que ocurre la luteólisis (en la última onda) se torna en folículo ovulatorio. (21).

Si bien aún no se han determinado todos los factores que afectan el desarrollo folicular aparentemente no hay diferencias de fertilidad entre las vacas de 2 ondas y de 3 ondas. Sin embargo, factores como el nivel nutricional de estrés calórico y estacionalidad pueden modificar el patrón de desarrollo folicular. . (19).

1.5.1.-FOLICULOGENESIS

En los mamíferos, folículo génesis se inicia en la vida fetal. Células germinales primordiales del saco vitelino migran a las gónadas en formación. Estas células germinales se multiplican por mitosis y grupos de oogônias se forman, conectadas entre sí por interacciones citoplasmas.(22).

En esta etapa, oogônias están rodeados de células somáticas en el mesodermo, formando los cordones corticales que son precursores de folículos primordiales. El oogônias se va diferenciar en ovocitos, que formarán folículos primordiales cuando se asocia con las células de la granulosa.(22).

Los ovocitos luego inician las divisiones de la meiosis, pero hay una interrupción a la profase de meiosis I, en la etapa diplóteno. Esta interrupción dura hasta que el folículo sea activado, durante lo período de actividad reproductiva empezando en la pubertad (56).

Coincidiendo con el inicio de la meiosis, folículos primordiales son individualizados de cordones corticales y que se caracterizan por el ovocito rodeado de una sola capa de células granulosas planas. Un elevado número de folículos se degeneran en esta etapa y el resto de folículos serán la reserva folicular del ovario.(42).

Después de la creación de la reserva folicular, un número de folículos se someten a la activación, al parecer, de acuerdo con la cronología de su formación. Este proceso de activación dura para toda la vida reproductiva (16).

El reclutamiento folicular no es totalmente conocido. Es relativamente bien aceptado un de los factores locales que actúan en el comienzo del crecimiento folicular, como ligando Kit (17).

Desde su activación, el folículo primordial se convierte en folículo primario que presenta las células de la granulosa en una forma de cubos. El ovocito parece que sólo se someten a un proceso de maduración de base, ya que su tamaño no cambia significativamente.(19).

Una modificación notable es el surgimiento de la zona pelúcida, una estructura presente entre el ovocito y las células de la granulosa a lo largo de todo el crecimiento folicular.(54).

Las variaciones genéticas en las proteínas de zona pelúcida se asoció con resultados poco satisfactorios en la fecundación in vitro, destacando la importancia de una evaluación precisa de esta estructura en los ovocitos (54).

Folículos secundarios presentan un ovocito más grande, un bien desarrollado zona pelúcida, y por lo menos dos capas de células granulosas. Durante la formación de los folículos secundarios, algunos marcadores se ha informado, como activina Al final de esta etapa, el papel desempeñado por las gonadotrofinas puede ser detectado y las importantes acciones de FSH y LH se inician. Algunos marcadores, como Activina y su proteína de unión - Pholistatina - se han identificado de primordial a los grandes folículos antral (16).

La siguiente etapa es el folículo terciario, que presenta varias capas de células granulosas y el inicio de la formación del antro. FSH ha sido

considerada como un factor esencial, debido a sus funciones endocrinas y para crinas. Por ejemplo, la FSH hace una asociación con la modulación del familia FGF, como el FGF.8.Después de esto, un acontecimiento muy importante se pueden distinguir: la formación del antro, lo que representa un notable paso de crecimiento folicular.(16)

El desviación y dominancia folicular san modificaciones cruciales en este momento y aspectos importantes acerca de LH y su receptor se han descrito en esta etapa. La presencia de líquido folicular permite las evaluaciones ecográficas, un método esencial para los estudios in vivo, hasta el destino final del folículo: atresia o la ovulación. (14).

1.5.2.- OVOGENESIS.

En las hembras la célula germinal es el oogonio Durante esta etapa la célula crece hasta convertirse en un ovocito primario (diploide) En esta etapa ocurre meiosis II y la primera división del citoplasma. (54).

Se forman dos células distintas; una llamada cuerpo polar y la otra ovocito secundario, ambas haploides. • Luego cada una de ellas se divide, meiosis II y se forman dos cuerpos polares más y un óvulo., todos haploides.(55).

Ovogénesis es el proceso de formación y diferenciación de los gametos femeninos u óvulos, pasando de Ovogonia a Ovocito primario, Ovocito Secundario y Óvulo.(56).

Diferencias con la espermatogénesis: Mientras que en la espermatogénesis se producen muchas células pequeñas y móviles, en la ovogénesis se obtiene una gran célula, con grandes reservas de enzimas, RNAs, organelos y substratos metabólicos, todo esto necesario para el desarrollo del embrión.(54).

Mitosis y Meiosis en la ovogénesis

- Ovogonia
- Ovocito primario
- Ovocito secundario
- Óvulo

Fuente: (56)

1.6.- ETAPAS DE LA OVOGÉNESIS

(a)La Ovogonia entra en un período de crecimiento que dura aproximadamente 7 días y se transforma en un ovocito de primer orden.

(b)El ovocito de primer orden entra a la primera división meiótica originando dos células, una grande llamada ovocito de segundo orden y una pequeña que se denomina primer glóbulo polar.

(c) Tanto el ovocito de segundo orden como el primer glóbulo polar, entran a la segunda división meiótica y originan: El ovocito de segundo orden forma dos células llamadas: ovótida u óvulo y segundo glóbulo polar; El primer glóbulo polar se puede dividir en dos células llamadas segundos glóbulos polares. (57).

1.7.- ESTRUCTURA DEL ÓVULO.

1.7.1.- Compuestos citoplásmicos

Hay proteínas vitelinas y aminoácidos que son fabricados en una parte del cuerpo y posteriormente transportados por los vasos sanguíneos hasta el óvulo. Hay muchos ribosomas y ácidos ribonucleicos de transferencia, que están en el citoplasma del ovocito, ya que tras la fecundación hay una exagerada síntesis proteica. Tienen hasta un millón de RNAs. RNAm, que pueden estar inactivos y en cierto momento se activan para desencadenar la síntesis proteica. citoplasmáticos o morfo genéticos, repartidos por el citoplasma. (57).

El ovulo está formado por una membrana protoplasmática o vitelina, protoplasma o vitelo, y núcleo o vesícula germinativa. Núcleo: contiene el genoma materno. El núcleo recibe el nombre de vesícula germinativa. El nucléolo aparece más oscuro, por lo que se denomina mancha germinativa. Generalmente el núcleo, junto al plasma activo, se desplaza hacia un extremo del ovulo dando lugar al polo animal, que será el que origine al embrión. El deutero plasma tiende a ocupar la región opuesta del núcleo, dando lugar al polo vegetativo. Los óvulos están protegidos por una serie de envolturas, una envoltura primaria o membrana vitelina (membrana

plasmática de la célula), que está rodeada por una membrana secundaria constituida por células foliculares, en la que se distinguen dos capas, zona pelúcida y corona radiada. (58).

La primera de las dos divisiones meióticas, la que reduce el número de **cromosomas**, se completa antes de la **pubertad**. Luego de completar la meiosis de los ovogonios, además de un ovocito se habrán formado tres cuerpos polares. Cabe mencionar que la meiosis se detiene en la metafase II y sólo se reanuda cuando el ovocito es **fecundado**, al mismo tiempo se libera el tercer corpúsculo polar. (58).

1.8.- CRIOCONSERVACION DE OVOCITOS.

Es el proceso de congelar muestras biológicas para reducir su actividad metabólica y mantenerlas a temperaturas muy bajas durante tiempos prolongados, preservando al mismo tiempo su viabilidad. La congelación de células vivas es un proceso fisicoquímico complejo de transporte de calor y agua entre la célula y el medio que la rodea. Tanto la criopreservación de ovocitos como la de embriones se llevan a cabo mediante la exposición de ambos a temperaturas muy bajas.(23).

El objetivo esencial de la criobiología es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular considerándose la supervivencia a la congelación

como el producto de numerosos efectos que interaccionan entre sí (Vila, 1984). Al conservar células a temperaturas extremadamente bajas(196°C) es posible detener por completo la actividad enzimática, la respiración celular, el metabolismo, el crecimiento, la multiplicación, etc. Es decir, se puede mantener las células durante un largo periodo de tiempo sin afectar su viabilidad (Schneider y Mazur, 1984). No obstante, la mayoría de las células mamíferas mueren cuando se exponen a bajas temperaturas, a menos que previamente hayan sido expuestas a una solución que las proteja y a rangos de enfriamiento y calentamiento específicos (25).

La criopreservación de material biológico tiene lugar usualmente en soluciones acuosas, con diferentes solutos presentes. Según Macfarlane (1987) cuando los líquidos de una solución acuosa son sometidos a la congelación, uno de sus componentes presenta la formación de una fase cristalina, mientras que el resto permanece en forma sólida con apariencia de vidrio, sin la formación de cristales de hielo.(23).

La temática de conservar ovocitos fecundados se han desarrollado un gran número de investigaciones sobre éste investigación con el fin de crear bancos de germoplasma que garanticen la disponibilidad de este material de alto valor genético durante largos períodos de tiempo sin perder su viabilidad y a su vez resolver los problemas de disponibilidad de receptoras perfectamente sincronizadas por una parte y la no obtención de embriones transferibles en algunas donantes.(25).

La posibilidad de congelar abre las perspectivas para el intercambio comercial entre países salvando las regulaciones sanitarias, facilitando y abaratando la transportación de éstos, brindando los beneficios de un material genético altamente valioso. (23).

1.8.1.- FUNDAMENTOS DE LA CRIOPRESERVACION BASICA.

TRANSPORTE A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS DURANTE LA CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN

Las bajas temperaturas (asociadas al aumento de la rigidez de la membrana) y la rapidez (décimas de segundo) con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hacen muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo (dependientes de ATP), la disminución de temperatura desde 25°C a 10°C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP y la difusión facilitada o como transporte (transporte concomitante de dos moléculas a través de la membrana dependiente una de ellas de ATP y/o iones H⁺), en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico.(24).

La difusión es un proceso mediante el cual las moléculas de una sustancia tienden a alcanzar una distribución homogénea en todo el espacio que les es accesible. La magnitud de la tendencia a difundir

desde una zona a otra si esta presente una membrana que separe las dos zonas esta definida por la ley de difusión de Fick, que relaciona el gradiente entre las dos zonas (gradiente químico o de concentración), las características de la membrana (grosor, área de sección transversa y permeabilidad para un determinado soluto), es directamente proporcional a la superficie (área) de la membrana y a la diferencia de concentración del soluto entre los dos lados e inversamente proporcional al espesor (grosor) de la membrana. La velocidad de la difusión es proporcional a una constante de difusión que depende de las propiedades de la membrana y de cada soluto en particular, un equilibrio puede conseguirse en segundos si la distancia es de micras, pero puede subir a varias horas si la distancia de difusión se incrementa a milímetros.(24).

La ósmosis es un caso especial de difusión en el que es el movimiento del disolvente el que se estudia, y se define en función de los solutos. La ósmosis es el movimiento del agua desde soluciones con baja concentración de soluto hasta soluciones con alta concentración de soluto y la presión osmótica es la presión hidrostática que se genera a través de una membrana semipermeable con un gradiente de concentración al lado y lado, depende del número de partículas de la solución.(25).

La presión osmótica se suele expresar en osmoles y depende exclusivamente del número de partículas disueltas (moles) por unidad de volumen, con independencia de su carga eléctrica, peso o fórmula química, es por tanto una propiedad coligativa (es decir las propiedades colectivas que una solución tiene cuando estos compuestos están presentes), los productos criopreservados se deben almacenar a temperaturas desde -133°C (vapores de nitrógeno líquido) a -196°C

(nitrógeno líquido). A estas temperaturas no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y por tanto las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación.(26).

La lesión celular crio inducida se explica en función de la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación, Merryman propone la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico), el volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad, en este caso los crioprotectores actuarían reduciendo por sus propiedades coligativas la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada.(27).

1.8.2.- AGENTES CRIOPROTECTORES (ACP)

Los crio preservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración

dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará mas deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor. Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores, los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa) y el dimetil sulfóxido, los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular.(28).

1.8.3.- LOS CRIOPROTECTORES PENETRANTES

Son de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana celular. Son utilizados: el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH). El dimetil sulfóxido es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por Lovelock en 1959, el DMSO se ha usado como un crioprotector. Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua. Se han sugerido las interacciones electrostáticas de DMSO con fosfolípidos lo cual parece ser crítico para la crioprotección de la membrana. El 1-2. propanediol ha sido utilizado principalmente para congelación de blastocistos y embriones en estado de preimplantación de humanos y otras especies.(28).

Interacción con los ACP durante la congelación y descongelación de las células deben ser definidos para establecer los límites físicos que aseguren la supervivencia de la célula (26).

ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS BIOFÍSICOS DE LAS CÉLULAS.

AGENTES CRIOPROTECTORES NO-PENETRANTES

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (ellos no obedecen la ley de Raoult). La adición del criopreservante per se genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los ACP y después se hidrata. (30)

Las células se comportan como osmómetros, por lo tanto variarán su volumen en respuesta a los cambios osmóticos extracelulares, así las células pierden o captan agua según se expongan a condiciones hipo o

hiper osmóticas, respectivamente; los movimientos de agua y crioprotectores a través de la membrana celular durante la criopreservación se rigen por diversos parámetros biofísicos que deben ser definidos para cada tipo celular a diferentes temperaturas.(32).

Los más estudiados son: 1.) el volumen osmó- ticamente inactivo (que se define como el agua que nunca dejará el interior celular en respuesta a un aumento de concentración de solutos en el espacio extracelular por estar asociado a las macromoléculas y estructuras intracelulares) que esta relacionado con la hipótesis de volumen mínimo de Meryman. y que se puede conocer mediante micro perfusión en un sistema de micro manipulación, 2.) la permeabilidad de la membrana celular (al agua, criopreservantes, solutos) que puede ser estudiada entre otras por un contador electrónico de partículas con un software específico, criomicroscopía.(29).

La técnica de escaneo calorimétrico diferencial (DSC) basada en que durante la deshidratación de la célula, sin congelación intracelular, se aumenta la concentración de electrolitos, sustratos, cofactores, proteínas celulares y asimismo se aumenta el transporte de agua al medio externo en congelación, este último fenómeno genera liberación de calor de fusión proporcional a la cantidad de agua removida de la célula. La célula es entonces lisada y el DSC mide repetidamente el calor de fusión emitido, estas diferencias son utilizadas para calcular el volumen de agua que ha atravesado la membrana; de esta última se puede deducir el volumen como una función de temperatura subcero,(30).

Un banco de células debe tener disponible los ensayos de viabilidad ya que estos son necesarios y pueden ser predictivos de la calidad de una muestra entendiendo que la viabilidad no es sinónimo de la vida. Los índices de viabilidad son específicos al mecanismo así como a la muestra biológica y la función moderada (una muestra particular puede tener más de un índice de viabilidad). La función que debe mantener la célula descongelada in vivo es la función ideal para medir un índice de viabilidad. La medición de esa viabilidad debe ser realizada por estudios de citometría mediante la incorporación del 7AAD y, en algunos casos, por ensayos de cultivos clonogénicos que aseguren la funcionabilidad del producto descongelado.(31).

1.9.- MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Podemos clasificarlos de acuerdo a la velocidad de congelamiento y descongelamiento en protocolos de congelación lenta-descongelación lenta, congelación lenta-descongelación rápida en las cuales la adición del crio protector suele hacerse por pasos y el descenso de la temperatura se realiza lentamente en un congelador programable. La descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño de agua a 30°C para evitar la recristalización. La congelación ultrarrápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones, por Trouson en 1986. Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, usualmente DMSO y sacarosa, seguida de inmersión en nitrógeno líquido. La vitrificación tampoco requiere la utilización de un congelador programable; se basa en la congelación rápida en una mezcla de altas concentraciones de

crioprotectores, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un sólido amorfo, sin formación de hielo.(32).

BANCOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS:

A condición de esterilidad iatrogénica posterior a quimioterapia o radioterapia en patologías neoplásicas, puede ser evitada con la criopreservación de ovocitos, adicionalmente, mujeres que sufren otras patologías del sistema reproductivo (falla ovárica prematura, endometriosis, quistes, infecciones pélvicas), o mujeres quienes desean postergar la maternidad pueden asegurar su potencial de fertilidad usando esta técnica.(28).

La ovogénesis involucra cambios bioquímicos y estructurales en el núcleo, el oolema y el complejo oocito-granulosa, por lo tanto los elementos del citoesqueleto, la progresión del ciclo celular, la morfogénesis del huso, entre otros, son importantes factores determinantes para el desarrollo de protocolos de criopreservación específicos para cada estado de madurez.(33).

El almacenamiento y criopreservación del ovocito han sido mucho más complejos que los del gameto masculino y de embriones. Los ovocitos son extremadamente sensibles a la temperatura con eventual despolimerización de los microtúbulos del huso causados por los crioprotectores o los cristales de hielo formados durante la congelación y descongelación, la separación normal de las cromátidas puede ser

afectada durante estos procesos induciendo así aneuploidias; el bajo número de embarazos posterior a la criopreservación de ovocitos refleja las dificultades técnicas de los procedimientos de congelación.(34).

Por otra parte, el ovocito es una gran célula y por lo tanto tiene una baja relación de área de superficie a volumen, esto impide la supervivencia post criopreservación viéndose alterada principalmente la zona pelúcida por liberación prematura del contenido de los gránulos corticales, disrupción de la membrana plasmática, desorganización extensiva del ooplasma y alteraciones en el citoesqueleto.(35).

La evidencia de los daños presentados en ovocitos congelados condujo al desarrollo de congelación de ovocitos en estados más inmaduros como es el caso de los folículos primordiales y vesículas germinales, con tasas de éxito aún limitadas, ya que resulta difícil lograr su desarrollo in vitro en estadios más maduros. Esta misma dificultad llevó a los investigadores a diseñar protocolos de congelación para ovocitos en metafase II. Variedad de métodos han sido expuestos, algunos utilizando DMSO y posteriormente el 1,2 PROH, como también tasas de congelamiento lentas de 0,3- 0,5°C/min hasta llegar a -40°C o -80°C(36).

Otras técnicas varían la temperatura, el tiempo de exposición al crioprotector, la temperatura para realizar el seeding y la utilización de sucrosa en conjunto con otros CPA. Actualmente se han desarrollado protocolos de congelación ultrarrápida-descongelación rápida, utilizando altas concentraciones de crioprotectores previniendo así la formación de cristales de hielo y la inducción de un medio amorfo y vítreo. Trounson fue

el primero en aplicar esta estrategia a la criopreservación de ovocitos por la inmersión directa del ovocito en el nitrógeno líquido (congelación ultrarrápida) y la subsiguiente descongelación hecha a 37°C en un baño de agua.(37).

En otro proceso llamado vitrificación, una solución de crio protectores altamente concentrados se solidifica durante la congelación sin la formación de cristales de hielo, en un fluido altamente viscoso y súper enfriado, este método demostró algunas ventajas claras compradas con la congelación lenta debido a que es evitada la formación de hielo extracelular. La combinación de una alta tasa de enfriamiento (cerca de los 1.500°C/ min) y altas concentraciones de crio protector tales como DMSO, acetamida, polietilenglicol (PEG), son requeridos para la vitrificación. Trounson reporta aceptables tasas de sobrevivencia y fertilización pero bajas tasas de clivaje, quizás debido a daños en el citoesqueleto. En términos generales el crioprotector en la solución determina una leve disminución en el punto crioscópico de esta (-2°C o -3°C). El efecto protector es principalmente un resultado de la capacidad de estas moléculas de formar uniones de hidrógeno que alteren la estructura cristalizada normal del agua. A través de sus grupos OH, el glicerol y el PROH por ejemplo, pueden formar uniones de hidrógeno con el agua mientras que el DMSO lo hace a través de los átomos de oxígeno. Los CPA reducen el efecto dañino de la alta concentración de electrolitos en la porción de agua en su estado líquido. En sistemas que son constituidos por dos fases a una presión constante tales como el hielo y el agua, la concentración total de solutos en la fase líquida es constante y, debido a esto la adición de CPA reduce la cantidad de agua que se cristaliza.(38).

CAPÍTULO II

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

En el segundo capítulo se detalla la metodología utilizada en la investigación, características y ubicación del lugar donde se realizó el experimento.

2.1.- Ubicación de la toma de Muestras.

País: Ecuador.

Provincia: Cotopaxi.

Cantón: Latacunga

Sector: Saquisilí

Nombre de la empresa: “El Camal tecnologico de Saquisilí”

➤ *Coordenadas geográficas*

Altitud: 2805 msnm.

Latitud: 0° 53´ 54.26´´ S

Longitud: 78° 37´ 32.95´´ W

Fuente: INAMI.

Elaborado por: GUTIERRES,Christian;2015.

2.1.- Características del lugar experimental .

La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad Técnica de Cotopaxi, en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (UA-CAREN), en la Carrera de Medicina Veterinaria, en el Laboratorio de Reproducción Animal.

Provincia: Cotopaxi.

Cantón: Latacunga
Parroquia: Eloy Alfaro.
Barrio: Salache Bajo.

➤ Coordinadas geográficas.

Latitud: 00° 59'47.68"S
Longitud: 78° 31'9.16"W.
Altitud: 2757.591 m.s.n.m.

• Datos meteorológicos.

Temperatura promedio: 10.7°C
Pluviosidad: 175 mm (anuales)
Horas luz/ día: 12 horas.
Viento: Sureste- Noreste.
Nubosidad anual: 4.7/8.

Fuente: Registros administración CEYPSA 2005.

2.2.- Recursos.

2.2.1- Recursos humanos.

- Tesista: Gutiérrez Cumbajin Christian Aníbal.
- Transporte: la movilización se lo realizo en transporte propio y de alquiler.

2.3.- Materiales.

2.3.1.- Materiales de campo.

- Instalaciones del Camal.
- Guantes estériles.
- Frascos de recolección.
- Termo de aislación térmica.
- Botas de caucho.
- Overol.
- Gafas y Mascarilla.
- Bisturí.
- Agua Fisiologica.

2.3.2.- Materiales de laboratorio.

- Etilen Glicol como crioprotector.
- Agua destilada.
- Centrifuga
- Holding.
- Jeringa de 10ml.
- Aguja calibre 22”.
- Estereomicroscopio.
- Holding (lavado).
- Tubos de ensayo.
- Nitrógeno.
- Termo de crio conservación.
- Pajuelas
- Canastillas.

- Placas Petri.
- Maquina de congelación depajuelas.
- Frascos estériles para transporte de muestras.
- Micropipetas.
- Puntas de Micropajillas.

2.3.3.- Materiales de oficina.

- Papelería.
- Computadora.
- Flash memory.
- Bolígrafos.
- Lápiz.
- Libreta de apuntes.
- Borrador.
- Cámara de Fotos.
- Material bibliográfico.
- Internet

2.3.4.- Material biológico.

- Ovocitos recolectados de ovarios de 20 vacas destinadas al faenamiento en el camal de saquisilí previa selección y compra de los mismos.

TIPO DE INVESTIGACIÓN.

2.3.6 Investigación Descriptiva

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

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.

2.5 .- 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.

2.5.1.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

2.6.- Manejo del Ensayo.

Tabla1: Cuadro de Variables e indicadores

VARIABLE	VARIABLE	INDICADORES
----------	----------	-------------

INDEPENDIENTE	DEPENDIENTE	
Crio conservación de ovocitos	Cantidad de ovocitos recuperados.	NÚMERO
	Estados de madurez de ovocitos.	NÚMERO
	Ovocitoscrioconservados.	NÚMERO
	Calidad de ovocitos pos descongelación.	PORCENTAJE

Fuente: Directa
Elaborado por: GUTIÉRREZ.Christian 2015.

Variables evaluadas

2.6.1 Calidad de ovocitos

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

- **Categoría 1.** Calidad buena, los ovocitos se encuentran completamente rodeados por tres capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo.
- **Categoría 2.** Calidad regular, los ovocitos están rodeados parcialmente por células del cúmulus o con citoplasma irregular.
- **Categoría 3.** Calidad mala, los ovocitos se encuentran totalmente desnudos.
- **Categoría 4.** Ovocito degenerado, los ovocitos se encuentran rodeados solo de fibrina. **(23)**

2.6.2 MADUREZ DE LOS OVOCITOS.

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

- **Categoría 1.** Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y rodeado en su totalidad por una masa compacta de células de cumulo.
- **Categoría 2.** Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y rodeado en forma parcial por células del cumulo.
- **Categoría 3.** Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y desprovisto de células del cumulo.
- **Categoría 4.** Ovocitos con citoplasma polarizado y rodeado en su totalidad por células del cumulo. **(44)**

2.6.3.- Obtención de los ejemplares.

La obtención de los ejemplares se llevó a cabo por medio de la autogestión al acudir al camal de Saquisilí y hablar con los introductores de ganado destinado al faena miento; una vez establecido los ejemplares se escogieron 20 vacas de raza Holstein Mestiza.

Al siguiente día la colecta de los ovocitos; se realizó post faena miento y para dicho proceso se acudió a las 4:00; am hora en que se realiza dicho proceso; para estar al pendiente de la segura extracción de los ovarios; una vez extraídos dichos órganos se procedió a envasarlos en cajas de orina estériles con agua fisiológica y en un termo aislante.

2.7. Selección del ovocito .

24 horas antes de la práctica se realizó la desinfección del lugar, la misma que se la realizo con un amonio cuaternario; el día de la práctica se procedió a la colocación de la vestimenta adecuada.

Se limpia de las estructuras anexas como ligamentos y bolsa ovárica en la parte sucia del ovario para luego dejar la parte limpia.

Seguido se realiza la técnica de aspiración folicular, que consiste en inocular el bisel de una jeringa en los folículos del ovario y jalar el embolo para extraer el líquido folicular y colocarlo en tubos de ensayo que luego se procederá a centrifugarlo a una velocidad de 600 giros por minuto para separar los ovocitos del liquido folicular y entonces ponerlo en una caja Petri con una gota de Holding.

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

2.7.1 Selección de ovocitos

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

Categoría 1. Calidad buena, los ovocitos se encuentran completamente rodeados por tres capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo.

Categoría 2. Calidad regular, los ovocitos están rodeados parcialmente por células del cúmulus o con citoplasma irregular.

Categoría 3. Calidad mala, los ovocitos se encuentran totalmente desnudos.

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

Los ovocitos de calidad 1 se procede a evaluar la madures con los siguientes criterios.

Categoría 1. Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y rodeado en su totalidad por una masa compacta de células de cumulo.

Categoría 2. Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y rodeado en forma parcial por células del cumulo.

Categoría 3. Ovocitos con citoplasma polarizado y rodeado en su totalidad por células del cumulo.

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

2.7.2 Crioconservacion de ovocitos

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

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

2.7.3 Descongelamiento de ovocitos

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

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

.. En este capítulo se detalla a continuación los resultados obtenidos al culminar el procedimiento de crio conservación lenta de ovocitos de bovinas

Resultados obtenidos de los ovocitos de cada vaca.
Se evaluó la cantidad de ovocitos de cada ovario,

TABLA N 1.- RESULTADOS GENERALES DE LA CANTIDAD DE OVOCITOS.

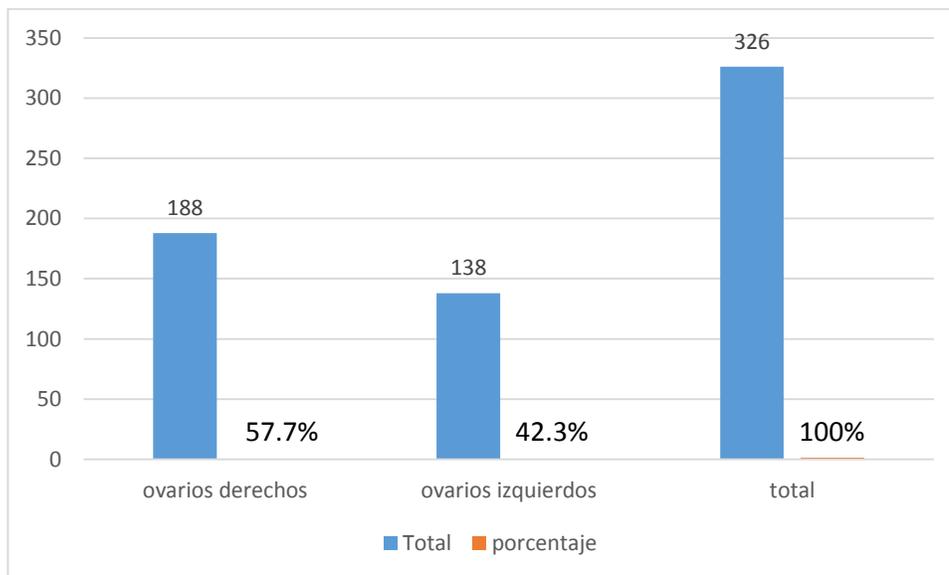
VACAS	OVARIOS	CANT.OVOCITOS POR OVARIO	Total
1	I	7	16
	D	9	
2	I	5	15
	D	10	
3	I	6	13
	D	7	
4	I	8	17
	D	9	
5	I	9	19
	D	10	
6	I	7	18
	D	11	
7	I	5	13
	D	8	
8	I	7	16
	D	9	
9	I	6	17
	D	11	
10	I	4	16
	D	12	

11	I	9	24
	D	15	
12	I	9	15
	D	6	
13	I	9	18
	D	9	
14	I	10	17
	D	7	
15	I	6	18
	D	12	
16	I	8	18
	D	10	
17	I	6	15
	D	9	
18	I	5	13
	D	8	
19	I	7	16
	D	9	
20	I	5	12
	D	7	
	TOTAL	326	326
	PORCENTAJE	100	100

FUENTE: Directa

ELABORADO POR: GUTIERREZ, Christian

Grafico N.- 1 RESULTADOS GENERALES DE LA CANTIDAD DE OVOCITOS.



FUENTE: Directa

ELABORADO POR: GUTIERREZ, Christian.

La presente investigación en marca la cantidad de ovocitos extraídos con la técnica de aspiración folicular de 20 animales lo más homogéneos posibles; en donde se obtuvo 40 ovarios de, los cuales en el ovario derecho se extrajo 188 ovocitos lo que representa el 57.7% y del ovario izquierdo la cantidad de 138 ovocitos lo que representa el 42.3% dando como deducción la mayor producción de ovocitos en el ovario derecho según tabla 1 y grafico 1

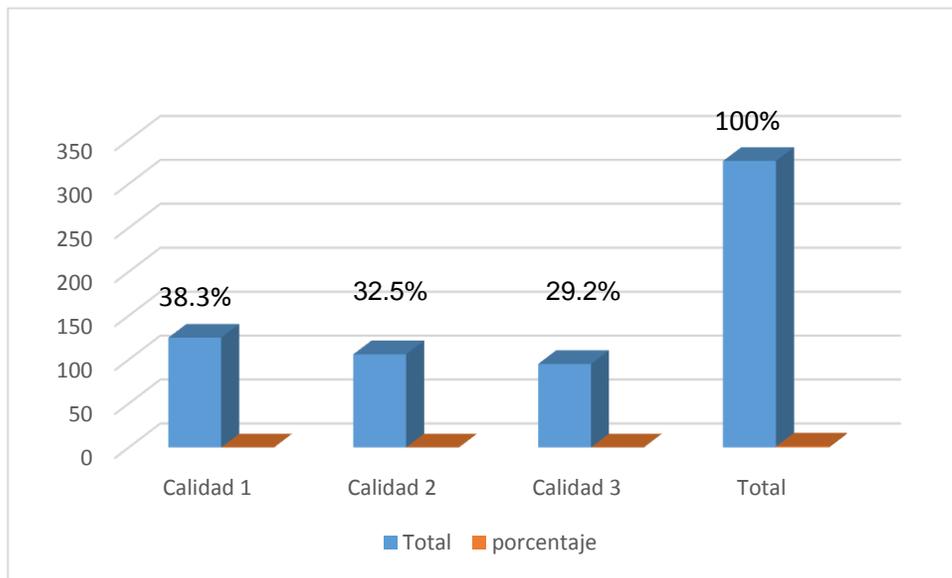
Autor: Las hembras de bovino llevan su gestación y producción de ovocitos en mayor porcentaje en el ovario derecho por presentar mejor adaptabilidad anatómica en ese lado de su cuerpo. Anibal.A.2001. (9).

Cuadro N.-2. Evaluación de la calidad de los ovocitos

Vacas	Calidad 1	Calidad 2	Calidad 3	Total
1	4	5	7	16
2	7	5	3	15
3	6	4	3	13
4	6	5	6	17
5	8	8	3	19
6	7	7	4	18
7	5	5	3	13
8	4	4	8	16
9	3	4	10	17
10	4	6	6	16
11	9	10	5	24
12	6	5	4	15
13	9	0	9	18
14	8	3	6	17
15	7	8	3	18
16	8	9	1	18
17	5	5	5	15
18	7	6	0	13
19	7	5	4	16
20	5	2	5	12
Total	125	106	95	326

porcentaje	38.3%	32.5%	29.2%	100%
------------	-------	-------	-------	------

Grafico. N.-2. Evaluación de la calidad de los ovocitos



FUENTE: Directa

ELABORADO POR: GUTIERREZ, Christian.

Los presentes datos demuestran la cantidad de ovocitos extraídos con la técnica de aspiración folicular de 20 animales lo más homogéneos posibles; en donde se obtuvo 326 ovocitos de, los cuales de calidad 1 se extrajo 125 ovocitos lo que representa el 38.3%% y de calidad 2 la cantidad de 106 ovocitos lo que representa el 32.5% y de calidad 3 la cantidad de 95 ovocitos lo que representa el 29.2% según tabla 2y grafico 2.

Autor: una de las mayores problemáticas para la reproducción es la escasa producción de ovocitos de buena calidad lo que dificulta las tasa de preñez en hatos lecheros. virbac(2012).

Cuadro N.- 3 selección de la madurez de los ovocitos de calidad 1

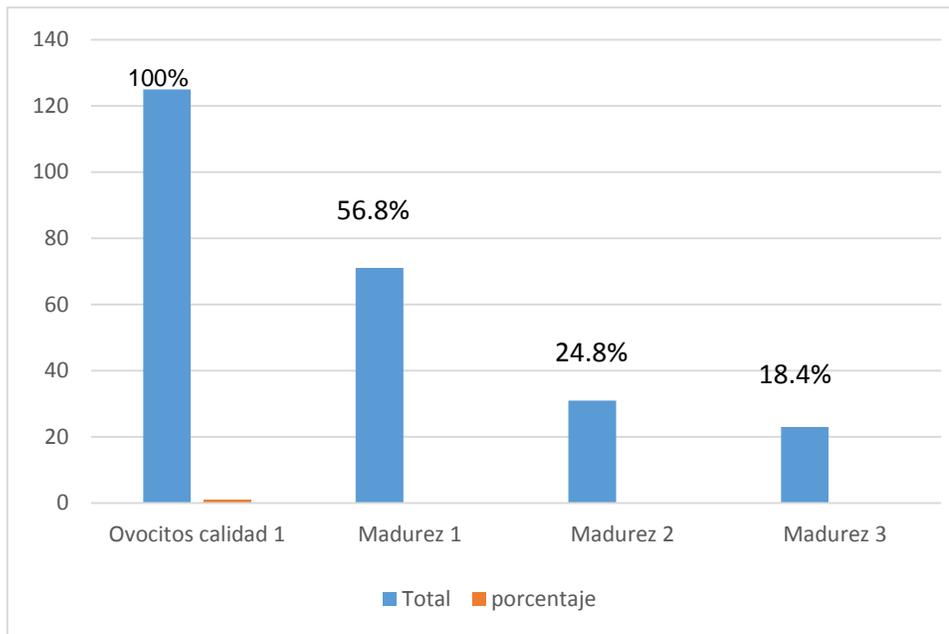
vacas	Ovocitos calidad 1	Madurez 1	Madurez 2	Madurez 3
1	4	2	1	1
2	7	3	2	2
3	6	4	2	0
4	6	3	0	3
5	8	5	2	1
6	7	4	2	1
7	5	5	0	0
8	4	2	0	2
9	3	2	1	0
10	4	2	2	0
11	9	3	3	3
12	6	2	0	4
13	9	4	3	2
14	8	5	2	1
15	7	6	1	0
16	8	5	2	1
17	5	3	1	1
18	7	4	3	0
19	7	4	2	1

20	5	3	2	0
Total	125	71	31	23
porcentaje	100%	56.8%	24.8%	18.4%

FUENTE: Directa

ELABORADO POR: GUTIERREZ, Christian.2015

Gráfico. N 3 .selecciones de la madurez de los ovocitos de calidad 1



FUENTE: Directa

ELABORADO POR: GUTIERREZ, Christian.

De acuerdo al gráfico N.- 4. la cantidad de ovocitos extraídos con la técnica de aspiración folicular de 20 animales lo más homogéneos

posibles; en donde se obtuvo 125 ovocitos de calidad 1 de, los cuales obtuvimos 71 ovocitos de madurez 1 lo que representa el 56.8% y obtuvimos 31 ovocitos de madurez 2 lo que representa el 24.8% y obtuvimos 23 ovocitos de madurez 3 lo que representa el 18.4% según tabla 4 y grafico 4.

Autor: El numero de ovocitos de alta madurez es menor a los ovocitos inmaduros debido a que estos ultimos no han atravesado la fase de selección y dominancia en vivo. BARROS, C. M., 2012

Tabla N.- 4 análisis general y post descongelación.

	Crio conservados	descongelados	viables	Dañados
ovocitos	71	71	67	4
porcentaje	100%	100%	95%	5%

FUENTE: Directa

ELABORADO POR: GUTIERREZ, Christian

Grafico N.- 4 análisis general y post congelación.

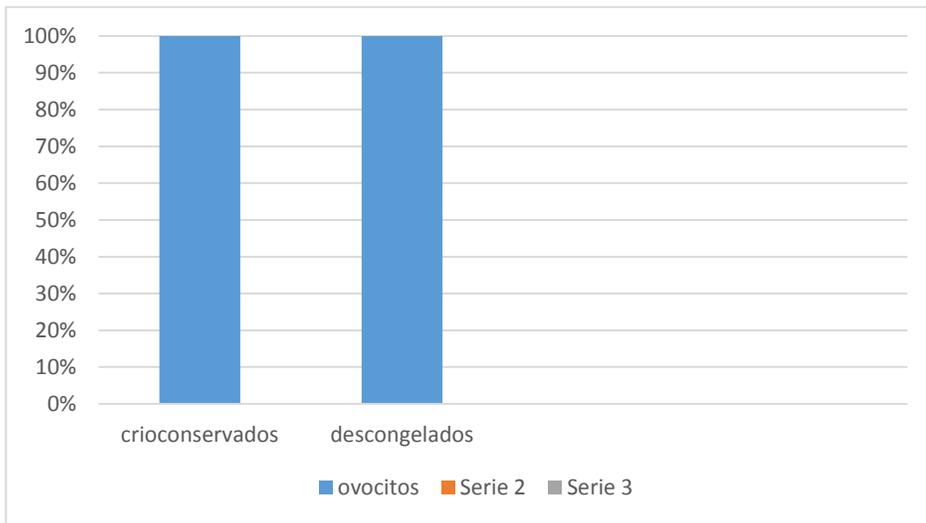
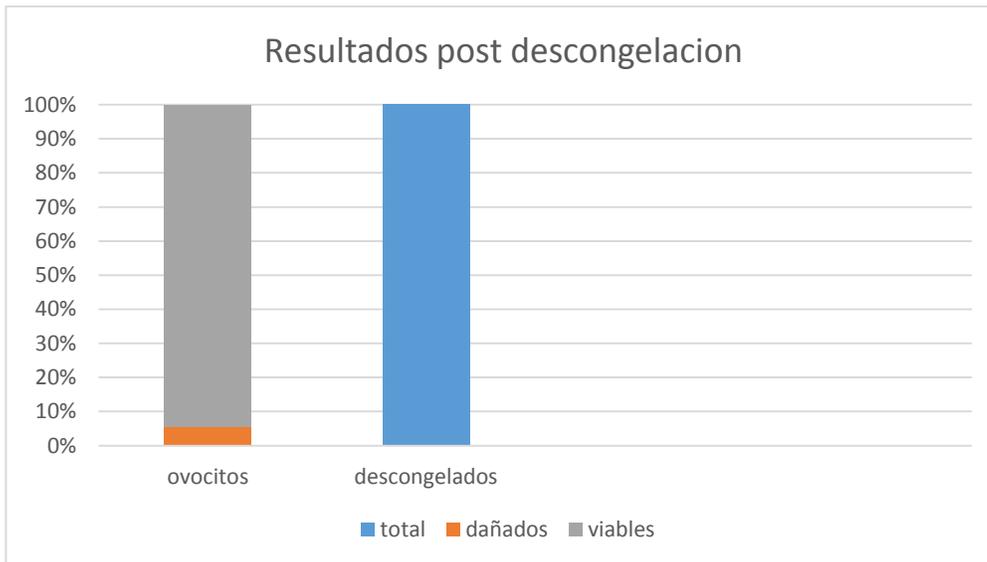


Gráfico N5.- viables y dañados



FUENTE: Directa

ELABORADO POR: GUTIERREZ, Christian

De acuerdo a los datos obtenidos este grafico demuestra la cantidad de ovocitos de calidad 1 que fueron crio conservados cuya cantidad es de 71 lo que representa el 100% con la cantidad de ovocitos que fueron descongelados cuya cantidad fue de 71 lo que representa el 100%; en donde se obtuvo 67 ovocitos viables lo que representa el 95%, y se obtuvo 4 ovocitos dañados lo que representa el 5% según tabla 5 y grafico 5 y grafico 6.

CONCLUSIONES

- Mediante la realización de esta investigación se logró determinar las características de los ovocitos clasificándolos

en calidad 1, 2,3 mediante su morfología presentes en los mismos mediante la observación en microscopía, dando como resultado que se extrajo el 38.3 % de calidad 1, el 32.5% de calidad 2 y el 29.2% de calidad 3.

- Mediante la evaluación de la calidad de los ovocitos; por medio de la misma técnica de microscopía se pudo determinar la madures de los mismos catalogándoles en 1, 2 y 3 de los cuales el 56.8% de madurez 1, el 24.8% de madurez 2 y el 18.4% de madurez 3.
- Luego del proceso de descongelación se pudo evaluar las características de calidad y madures de los ovocitos para observar su viabilidad o su daño dando como resultado la viabilidad de un 95% y un daño del 5%.

RECOMENDACIONES

- Se debe seguir realizando investigaciones sobre el tema de crioconservación de ovocitos bovinos 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, con la finalidad de incorporar una herramienta confiable para aumentar la producción, selección y comercialización de embriones bovinos, 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 Ganado súper productor en el Ecuador.

BIBLIOGRAFÍAS

- 1.- Horacio R. Zeballos; (2010) Méd. Vet. .Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Producción Animal. Zootecnia.
- 2.- .Jica.go.(2011).jp/project/Bolivia.eficiencia economicabovina.
- 3.- Bavera, G. A. 2005.clasificacion taxonómica del bovino hembra, FAV UNRC
- 4,. Thomas.J, P. G. 2000.. (España). *El aparato reproductor del bovino hembra* Jornadas Profesionales
- 5.- Dr.: Ray Nebel, (2005). Especialista en Reproducción Archivo pdf. Anatomía y fisiología de la reproducción bovina. Select reproductive solutions.
- 6.- Fabio.A. 2006 *Resultados de gestión en España..reproduccion bovina.*
- 7.- .Antoni2003,anatomía reproductiva del bovino..
- 8.- .Leo . 2008.--estructura de la vulva del bovino hembra.,
- 9.- Anibal.A ..- 2001. *Biotecnología de la reproducción. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria., Republica cubana..*
- 10.- Hafez, E. S. E. 2000. *Some maternal factors causing post-implantation mortality in the rabbit.* VI Cong. Reprod. Insem. Artif., Paris.
- 11.http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_ov/2BCH/B4_INFO.RMACION/T409_REPRO-DUCACION/informacion.htm(figura 1)
- 12.- virbac(2012).. webveterinaria.com/
- 13.- Miguel German Rivera .(2014).Gaona.facultad de medicina veterinaria del Tolimba VENEZUELA
- 14.- Rebollar, P. G. 2003. *Inseminación artificial. Control de la reproducción bovina.*, Madrid.
- 15.- García-García. 2007a. Actas de II XXXII Symposium Importancia de la reproducción de ASESCU. Jornadas Ibéricas sobre reproducción. Vila Real (Portugal). Boletín de Veterinaria., 151, 41-44.

- 16.- Palma, G. 2003. *Biotecnología de la reproducción. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, Buenos Aires, Argentina. 11-13
- 17.- García-Palencia. 2007 *ovario de bovino en diferentes estado fisiológicos*. Actas de II XXXII Symposium de ASESCU. Jornadas Ibéricas sobre Bovinotecnia. Vila Real (Portugal).
- 22.- Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 57 No. 4 • 2006 • (291-300)
- 23.- ÁVILA Coria, 2003. Criopreservación de células, Trabajo Monográfico, México, UNAM,
- 24..Jose_Madero2(2006)/publication/242707051_FUNDAMENTOS_DE_C RIOPRESERVACION
- 25.- Mathews K.M, 2003 van Holde KE, Ahern KG. Biochemistry. Third edition. Addison Wesley; p. 363-92
- 26.- Loken SD, Demetrik DJ. A novel method for freezing and storing research tissue bank specimens. Hum Pathol 2005;36:977-80
- 27.- Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. Cryobiology 1971;8:489-500.
- 28.- Porcu E. (2001)Oocyte Criopreservation. En: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z (eds). Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives. London, UK: Martin Dunitz Ltd;
- 29.- Armitage Pegg DE. 2003 Cryopreservation or umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. Cryobiology;46:76-87.
- 30.- Gilmore JA, 2000. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. Reprod;15:335-43.

- 31.- Yang JP, 2003. Effects of incubation temperature and time after thawing on viability assessment of peripheral hematopoietic progenitor cells cryopreserved for transplantation. *Bone Marrow Transplant*;10:21-6.
- 32.- Boiso I.2001. Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*;18(4).
- 33.- Albertini DF. The cytoskeleton as a target for chill injury in mammalian cumulus oocyte complexes. *Cryobiology* 1995;32:551-62.
- 34.- Van Blerkom J.2004,. Citogenetics cellular and developmental consequences of criopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. *Microsc Res Tec*;27:165-93.
- 35.- Shaw JM, 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocyte and ovarian tissue. *Theriogenology*;53:59
- 36.- Bernard A, 1996 . Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Hum Reprod Update*;2:193-207.
- 37.- Trounson A.2001. Preservation of human eggs and embryos *Fertil Steril*;46:1-12.
- 38.- Friedler S,2008. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril*;49:743-64
- 42.- CUNNINGHAM, James; 2007. *Fisiología Veterinaria*; 2003 Tercera Edición España; ISBN 848174692.
- 54.- RECOSTI, Antonio, 2007. *Fisiología en Animales Domésticos*; Quito Ecuador-Tesis.
- 55.- SANDOVAL, Elsa Margarita; 2007. *Inseminación Artificial Intravaginal en bovinos con semen congelado*; tesis Quito-Ecuador.
- 56.- SEQUERA, Johana; 2003. *Procesos reproductivos de bovino*; Argentina, ISBN 8496344088.
- 57.- VILLA, María 2007; *Manual de Prácticas fisiología General*, Segunda Edición, Medellín Colombia
- 58.- WANKE, M. Magdalena; 2006. *Reproducción en bovinos*, Edición Española, ISBN 950555298-X.

59.- WILDT, D;2009..;.Relationship of serum estrone, estradiol and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch.BiolReprod.

19.- Palma, G. 2003. *Biología de la reproducción. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, Buenos Aires, Argentina.

20.- Beltran.G1º Congreso Internacional de la Sociedad Argentina de Tecnologías Embrionarias (SATE), 11 y 12 de Abril de 2013, Corrientes, Argentina.2010.

SITIOS WEB.

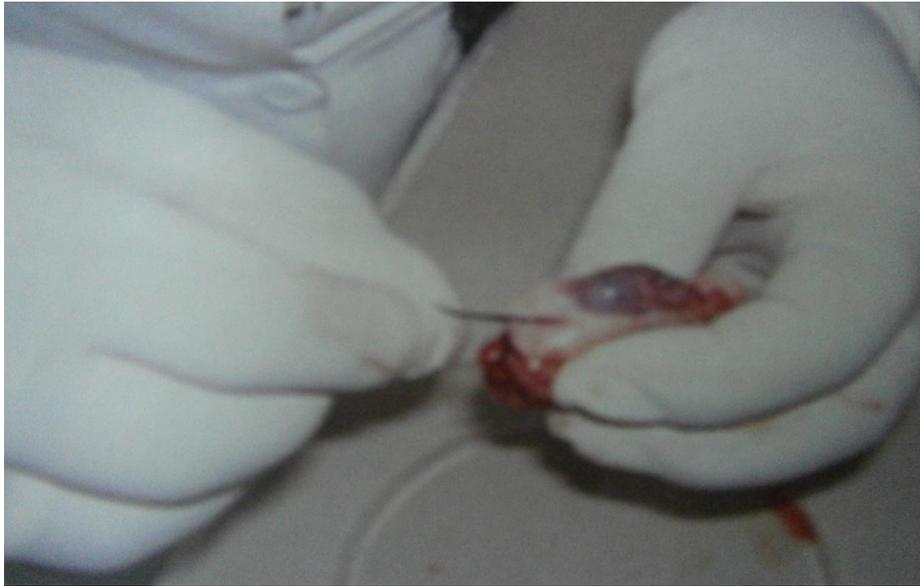
3,. <http://es.scribd.com/doc/99638472> /Taxonomia-de-Las-Vacas#scribd (cuadro)

18.- Paulino.E Servicios en Reproducción Bovina: gane eficiencia en su rodeo.<http://www.biotecnologiabovina.com/transferencia-embionaria/index.html>

21.- Centro de reproducción Barcelona <http://www.esimer.com/>(2011)

ANEXOS

1.- Limpieza del ovario para desprenderlo de estructuras anexas y absorción de líquido folicular.



2.-Aspiración del líquido folicular de los ovarios obtenidos.



3.- colocación de contenido folicular en tubos de ensayo para posterior centrifugación.



4.- Búsqueda de ovocitos en el estereoscopio.



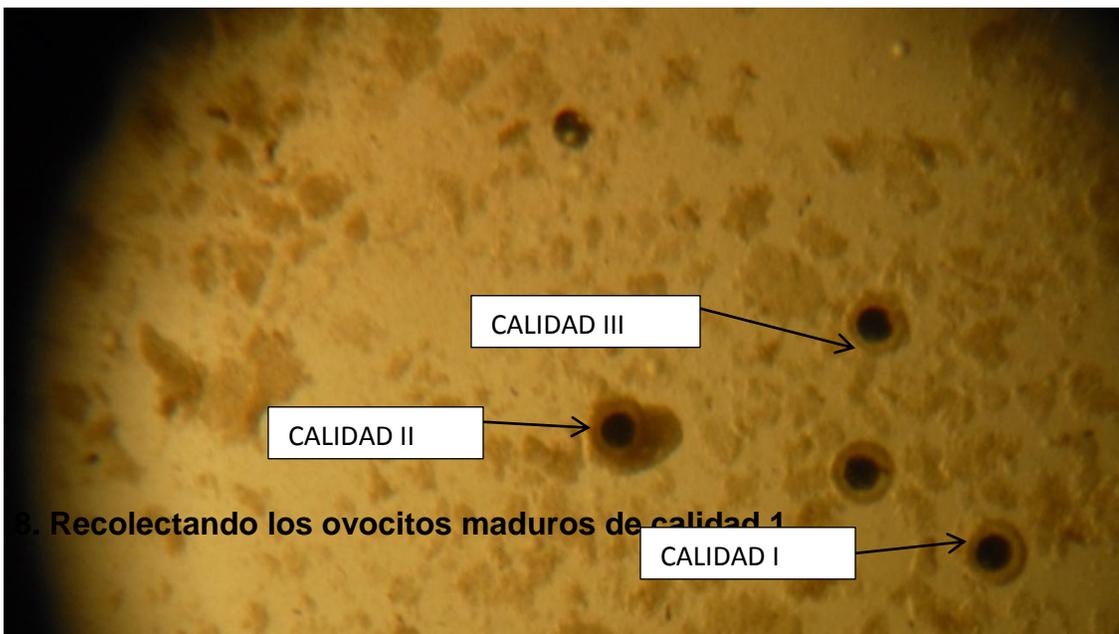
5.-Colocación del líquido folicular antes del lavado en holding.

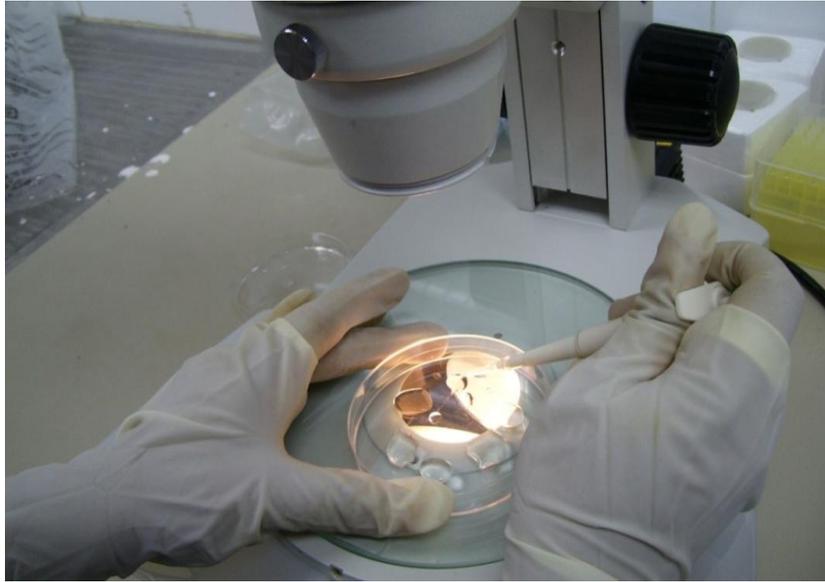


6.-Limpieza de los ovocitos en holding.

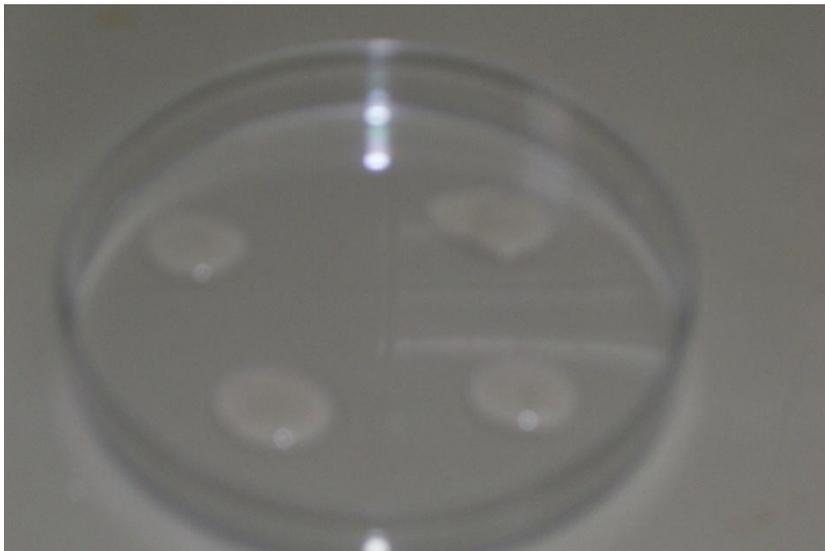


7.- Ovocitos de calidad uno que se utilizaran para el proceso de crioconservación.

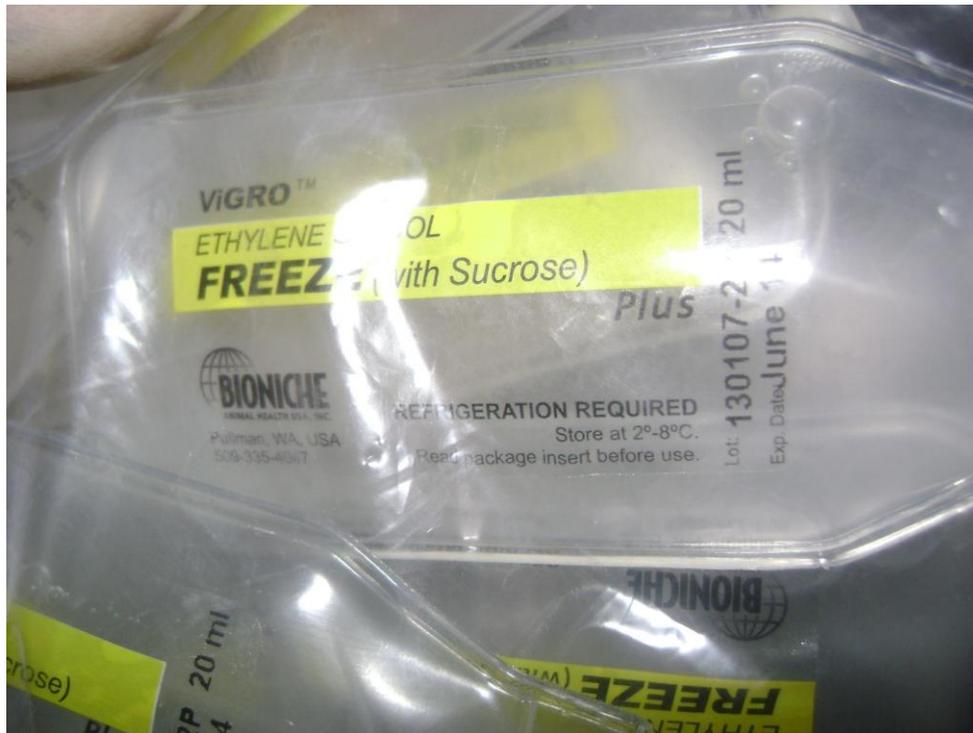




9.- Holding que contiene los ovocitos maduros de calidad 1.



10.-Crioprotector utilizado.



11. Equipo utilizado para la crio conservación.



12.- inspección de miembro opositor del tribunal.

