

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA



**TÍTULO: “EVALUACION DE LA PRODUCCIÓN INVITRO DE
EMBRIONES EN ANIMALES DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO
DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN LA CARRERA
DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE
COTOPAXI”**

**TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MEDICO
VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Autor: Nuvia Viviana Salguero León

Directora: Dra. Paola Lascano Armas.

Latacunga – Ecuador

2014

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
UNIDAD ACADEMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

AUTORIA

Yo, Salguero León Nuvia Viviana, en calidad de egresada de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, declaro que el trabajo aquí descrito, la responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis es de mi autoría y que no ha sido presentado para ningún grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica de Cotopaxi puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido con la ley de propiedad intelectual, por su reglamentó y por la normativa institucional vigente.

Nuvia Viviana Salguero León
C.I. 171920498-2
AUTOR

CARTA DE APROBACION DEL DIRECTOR DE TESIS

En mi calidad de director de tesis titulada **“EVALUACION DE LA PRODUCCIÓN INVITRO DE EMBRIONES EN ANIMALES DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”**. Propuesto por la egresada Nuvia Viviana Salguero León, 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.

Particular que pongo en su conocimiento para los fines legales pertinentes.

Atentamente,

Dra. Paola Lascano
DIRECTOR DE TESIS

CARTA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TESIS

En calidad de miembros del tribunal de grado aprueban el presente informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi y CAREN por cuanto, la postulante con el tema de tesis: **“EVALUACION DE LA PRODUCCIÓN INVITRO DE EMBRIONES EN ANIMALES DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de defensa de tesis.

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

Atentamente:

Dra. Mercedes Toro
Presidente del tribunal

Dra. Nancy Cueva
Miembro del tribunal

Dr. Diego Medina
Opositora del tribunal

**CARTA DE APROBACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DEL
IDIOMA INGLÉS**

En calidad de Docente del centro Cultural de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi, yo Lic. Marco Paúl Beltrán Semblantes con la cédula de Ciudadanía 050266651-4, certifico que la traducción del Español al Inglés de la tesis: Tema: **“EVALUACION DE LA PRODUCCIÓN INVITRO DE EMBRIONES EN ANIMALES DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”** TOPIC: **“EVALUATION OF IN VITRO PRODUCTION EMBRYOS IN PETS IN THE BIOTECHNOLOGY REPRODUCTION LABORATORY IN THE VETERINARY MEDICINE FACULTY AT TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI,** Corresponde al texto original en español .

Docente:

Lic. Marco Paúl Beltrán Semblantes
050266651-4

AGRADECIMIENTO

En estas breves líneas quiero nombrar su aporte fundamental a todos mis doctores,
por dar testimonio, con una paciencia inagotable a cada uno de nuestros

requerimientos, preguntas dudas y además en especial a los Doctores: Xavier Quishpe, Miguel Gutiérrez, Mercedes Toro y al Dr. Víctor Pallango

Gracias a todas y cada una de las personas que participaron en esta tesis, que invirtieron su tiempo y conocimiento para ayudarme a cumplir este sueño.

Dra. Paola Lascano mi directora, mis más sinceros agradecimientos por ser una persona incondicional y ser la guía inicial que me ayudó a que este sueño se haga una realidad.

Viviana Salguero

DEDICATORIA

Es para mí un honor, dedicar esta tesis a quienes confiaron y me apoyaron en toda mi vida estudiantil hasta el día de hoy que estoy cumpliendo con un gran sueño de tener

mi carrera profesional, como son mis padres Piedad León y Holguer Salguero quienes me brindaron los recursos necesarios y estuvieron a mi lado aconsejándome siempre.

Como no dedicarle a mis hermanos Adriana de las Mercedes, Darwin Mecías y Holguer David Salguero León, quienes de una u otra forma tuvieron que sacrificar su espacio y tiempo para estar conmigo cuando los necesité.

De igual forma mi gran reconocimiento a mi esposo Byron Hinojosa por tener paciencia en los días de ausencia y apoyarme incondicionalmente en el desarrollo de la tesis.

El tiempo ha pasado, y quiero dedicar de manera especial, a quien me levanto y me enseño a seguir adelante por más duras que sean los obstáculos, me acompañó más de 9 años y que estuvo en las travesías prácticas, en la mayoría de mis estudios, a ti Patricio Jofre que Dios te tenga en su gloria; Gracias por todo.

Nuvia Viviana Salguero León

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”

Nuvia Viviana Salguero León

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPITULO I

FUNDAMENTACION TEÓRICA.....	1
1.1. Concepto de producción en vitrio.....	1
1.2. Fisiología reproductiva general.....	1
1.3. Anatomía del aparato reproductor de la perra.....	2
1.3.1 Ovarios.....	3
1.3.2 Trompa uterina u Oviducto.....	3
1.3.3 Útero.....	3
1.3.4 Vagina.....	4
1.3.5 Vestíbulo vaginal.....	4
1.3.6 Clítoris.....	4
1.3.7 Vulva.....	4
1.4 Anatomía del aparato reproductor del perro.....	4
1.4.1 Testículos.....	4
1.4.2 Escroto.....	5
1.4.3 Epididimo.....	5
1.4.4 Conducto deferente.....	5
1.4.5 Próstata.....	6
1.4.6 Uretra.....	6
1.4.7 Pene.....	6
1.4.8 Prepucio.....	7
1.5 Ciclo estral de la perra.....	8
1.5.1 Proestro.....	9
1.5.2 Estro.....	9
1.5.3 Metaestro.....	10
1.5.4 Anestro.....	10
1.6 La fecundación monta natural.....	10
1.6.1 Cortejo.....	11
1.6.2 La cópula.....	11
1.7 Gametogénesis.....	12
1.7.1 Fisiología reproductiva del macho.....	12

1.8 Endocrinología del macho.....	13
1.9 Desarrollo de las células germinales de la hembra.....	16
1.9.1 Crecimiento de los oocitos	16
1.9.2 Ovulación y fertilidad de la perra.....	17
1.9.3 Clasificación de los ovocitos.....	18
1.10 Marco Conceptual.....	20

CAPITULO II

2. Materiales y métodos.....	22
2.1 Ubicación del experimento	22
2.1.1. Situación política	22
2.1.2. Situación geográfica	22
2.2 Materiales	24
2.2.1 Materia prima	24
2.2.2 Materiales de laboratorio.....	24
2.2.3 Materiales de oficina	25
2.3 Diseño metodológico.....	25
2.3.1 Tipo de investigación.....	25
2.3.1.1 Investigación descriptiva	26
2.3.1.2 Investigación explicativa.....	26
2.3.1.3 Investigación no experimental.....	26
2.4. Metodología	27
2.5 Unidad de estudio.....	27
2.6 Metodología y técnicas de investigación	27
2.6.1 Método deductivo.....	27
2.6.2 Método inductivo.....	28
2.6.3 Método analítico	28
2.6.4 Método sintético.....	28
2.7 Operacionalización de las variables o de las categorías fundamentales	29
2.7.1 Ovocitos colectados	29
2.7.2 Ovocitos maduros	29
2.7.3 Ovocitos atrésicos.....	30
2.7.4 Ovocitos fertilizados	30

<i>Conclusiones</i>	44
<i>Recomendaciones</i>	45
<i>Bibliografía</i>	46
<i>Referencias bibliográficas</i>	46
<i>Referencias virtuales</i>	47
<i>Anexo</i>	49

ÍNDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Ciclo estral de la perra</i>	8
<i>Cuadro 2. Las hormonas reproductivas y sus funciones en el perro</i>	15
<i>Cuadro 3. Clasificación y característica de los oositos</i>	19
<i>Cuadro 4. Categorización de ovocitos</i>	26
<i>Cuadro 5. Categorización de las Variables</i>	29
<i>Cuadro 6. Recuperación de ovocitos</i>	38
<i>Cuadro 7. Categorización de ovocitos obtenidos</i>	38
<i>Cuadro 8. Ovocitos maduros y atrésicos</i>	39
<i>Cuadro 9. Número de ovocitos fecundados</i>	40
<i>Cuadro 10. Número de embriones</i>	41
<i>Cuadro 11. Categorización de embriones generados</i>	42

ÍNDICE DE FIGURA

<i>Figura 1. Folículo de GRAF en el ovario de una perra</i>	17
<i>Figura 2. Ovocitos de gata clasificados como aptos para maduración In vitro</i> <i>Categoría I y II</i>	19
<i>Figura 3. Ovocitos de gata clasificados como no aptos para maduración In vitro.</i> <i>Categoría III y IV</i>	20

Figura 4. Mapa de ubicación donde se desarrolló el ensayo23

ÍNDICE DE GRÁFICO

Gráfico 1. Categorización de ovositos 39
Gráfico 2. Ovocitos maduros y atrésicos..... 40
Gráfico 3. Número de ovocitos fecundados..... 41
Gráfico 4. Embriones desarrollados atrésicos 42
Gráfico 5. Categorización de embriones generados..... 46

ÍNDICE DE ESQUEMA

Esquema 1. Ciclo estral 8
Esquema 2. Eje hipotalámico- hipófisis- testículos 14

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Cotopaxi. El objetivo principal del presente estudio fue evaluar embriones de animales caninos para una producción In Vitro. Es una técnica más que dispone la medicina Veterinaria al tratamiento de infertilidad, permitiendo mejorar la cría de los animales domésticos. Es de utilidad y aliento saber que mediante programas de transferencia de embriones bien establecidos y constante se pudo aumentar la producción de genética superior, siempre y cuando exista una serie de factores que son importantes para obtener buenos resultados los cuales se analizan más adelante. Para realizar la investigación se consideró como inicio a los ovocitos colectados, de este resultado cuanto llegaron a madurar y cuantos no maduraron denominados como atresicos, y de los ovocitos maduros cuantos fueron fertilizados y por ultimo dar como resultado a que si se pudo obtener Embriones de calidad.

ABSTRACT

The present research was carried out in the Biotechnology Reproduction laboratory of the Veterinary Medicine and Zootechnics Faculty at Technical University of Cotopaxi. The main objective of the present research was to evaluate canine embryos for a reproduction In Vitro. It is a technique that the veterinary medicine has in order to help the fertility process treatment, allowing to improve the pet breeding. It is useful and effort, Knowing that through well-established embryos and constant transference could increase the production of superior genetic, as long as there are series of important factors for good results that can be discussed later. To carry out the research, it was considered as the beginning the collected oocytes. From this result, how many matured and how many did not mature, which are called atretics, and from matured oocytes how many were fertilized and finally, as a result which quality embryos could be accomplished.

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 existencia de la especie animal tomando en cuenta nuevas alternativas que está revolucionando en la Medicina Veterinaria como es la Producción y Fertilización In Vitro engendrando nuevas camadas de la misma especie.

Los datos obtenidos mediante esta investigación si son positivos servirán a los criadores con pedigrí en perro domésticos, pequeños productores , estudiantes y técnicos como base bibliográfica para que puedan realizar una buena explotación, ya que con dicho tema de tesis se logrará conservar los genes de sus progenitores si estos ya han cumplido su fase de vida o están 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, 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.

Resulta de interés estudiar un esquema de tratamiento alternativo que permita disminuir el estrés en los animales; como es hermoso pensar que la producción In Vitro ayuda al rejuvenecimiento de la especie.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción In vitro de embriones en perros domésticos en el laboratorio de biotecnología para identificar la calidad y grado madures de los embriones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un protocolo de producción in vitro de embriones en perros domésticos.
- Determinar el número de ovocitos calificados de buena calidad.
- Identificar el número de ovocitos madurados.
- Evaluar el número de ovocitos fertilizados que generaron embriones.

HIPOTESIS

- **H1.-** Se podrá producir embriones In- vitro en perros domésticos en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción de la UTC.
- **H0.-** No se podrá producir embriones In- vitro en perros domésticos en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción de la UTC.

CAPITULO I

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1. Concepto de producción In vitro

De acuerdo a la investigación realizada podemos concluir que es aquella que mediante la cual se busca la unión entre el ovulo y el espermatozoide en una placa de cultivo de laboratorio en los cuales se obtiene embriones extracorpóreos que pueden ser manipulados, congelados e incluso escogidos arbitraria y discriminatoriamente para ser implantados provocando una gestación en la perra. Suele aplicarse cuando el problema de esterilidad no es debido a un daño uterino que impida la amidación del embrión (se aplica en enfermedades tubarica no reversible, endometritis rebelde al tratamiento médico quirúrgico, ligadura profiláctica de las trompas, ligadura de los conductos deferentes del macho), si la hembra no posee óvulos aptos para la fecundación, o si los espermatozoides no gozan de buena calidad se puede acudir a la donación de los mismos. (GRANJA, 2000)

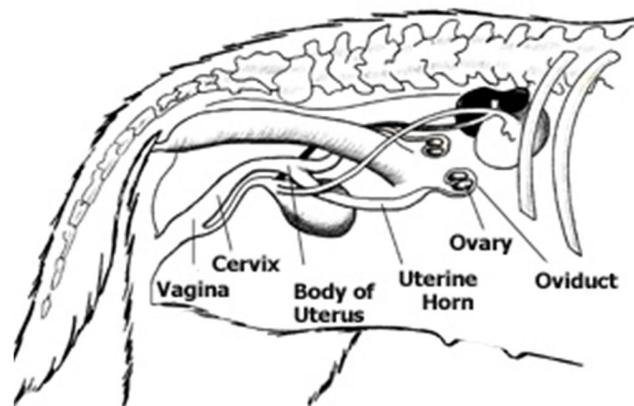
1.2. Fisiología reproductiva general

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. En la reproducción, el punto clave es el logro de la supervivencia de la especie, no la del individuo, y sabido es 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. En su primera etapa, las gónadas son todavía bipotenciales 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 bipotencialidad y se inicia la diferencia sexual. (ILLERA, 1979).

1.3. Anatomía del aparato reproductor de la perra

Consta de varios órganos, unos localizados en el interior del abdomen y otros en el exterior.



Fuente: (HORNED; 1999)

1.3.1. 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 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)

1.3.2. Trompa uterina u 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)

1.3.3. 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 a los 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. (ALVA, 2007)

El útero se encuentra formada también por tres capas: serosa, que en definitiva es una prolongación del peritoneo; muscular, llamada miometrio 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, 1979)

1.3.4. Vagina

En la perra es larga, con las diferencias propias entre las razas. Se halla entre el cuello uterino (cérvix) y el vestíbulo vaginal. Función: aquí es donde se produce la cópula y es la parte final del canal del parto. (WANKE, 2006)

1.3.5. Vestíbulo vaginal

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

Función: para la cópula. (CABREJOSSOLANO, 2008)

1.3.6. 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, 1999)

1.3.7. 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. (ALAVA, 2007)

1.4. Anatomía del aparato reproductor del perro

1.4.1. Testículos

El testículo de los mamíferos se originan cerca de los riñones; luego y aún dentro de la vida fetal, en muchas especies, pero no en todas, descienden del escroto; en

aquellos animales que no descienden antes del nacimiento, el testículo llega al escroto antes de la pubertad. (ILLERA, 1979).

Son dos, de forma elipsoidal, y alojados en el escroto. Están conformados por túbulos seminíferos, que es donde se originan los espermatozoides. Función: al igual que los ovarios en las hembras, tienen una función exocrina de producción y maduración de espermatozoides, y otra endocrina de producción de hormonas. (CABREJOSSOLANO, 2008)

1.4.2. Escroto

La bolsa o conjunto de vainas que conforman el escroto tienen la misión de proteger las gónadas masculinas (testículos) y de mantenerlos a una temperatura homogénea inferior al corporal en unos 2 ° C para no afectar a la espermatogénesis (producción de espermatozoides) y proteger el parénquima testicular. Por esta razón en verano está más distendido y con el frío se contrae y aproxima los testículos a la región inguinal. (ALVA, 2007).

1.4.3. Epidídimo

Es un largo tubo que almacena y transporta los espermatozoides. Se divide en cabeza, cuerpo y cola. Ésta se transforma gradualmente en el conducto deferente. Función: almacenamiento, transporte y maduración espermática. (WANKE, 2006)

1.4.4. Conducto deferente

Tiene su origen en la cola del epidídimo y asciende como un componente del cordón espermático, entrando a la cavidad abdominal a través del canal inguinal. Función: transporte de espermatozoides.(JONES, E.D.1984)

1.4.5. Próstata

Es una glándula que rodea el cuello de la vejiga y el comienzo de la uretra, abrazándola. Su tamaño varía de una raza a otra, de manera que en todos los perros *terrier* es más grande que en otros de similar tamaño sin que sea un problema para el perro. Es un órgano aplanado dorsalmente y redondeado central y lateralmente.(ILLERA, 1979).

Está contenido dentro de una cápsula y un tabique longitudinal lo divide en dos lóbulos, derecho e izquierdo. Función: producir el plasma seminal que ayuda a transportar y nutre a los espermatozoides. (CORDOVA, 2003)

1.4.6. Uretra

Tiene una primera parte que transcurre por la región pélvica, que es la uretra pelviana y la que sigue por el pene que es la uretra peneana o esponjosa. Función: también es mixta, ya que sirve para el transporte de orina desde la vejiga y también para el transporte de los espermatozoides y del líquido prostático en el eyaculado. (WANKE, 2006)

1.4.7. Pene

Se divide en raíz, cuerpo y glande. En estado de flaccidez el pene se encuentra totalmente dentro del prepucio. En el interior del pene hay un hueso, el *ospeniso* hueso peneano, que es una estructura alargada con un surco ventral que aloja a la uretra peneana. Este hueso ayuda en la penetración al mantener erecto el pene antes de la erección propiamente dicha. (ALAVA,2007).

Función: además de ser el final del aparato urinario, el pene en erección es el órgano que permite la penetración y el abotonamiento durante la cópula. (CABREJOSSOLANO, 2008)

1.4.8. Prepucio

Es una vaina tubular que se origina y es continuación de la piel del abdomen, y que recubre el pene flácido en su totalidad. Posee una mucosa interna lisa y una capa de piel externa cubierta de pelos que confluyen en el orificio prepucial. Segrega un líquido verdoso denominado *esmegma* que lubrica el pene y que es completamente normal. (CORDOVA, 2003)

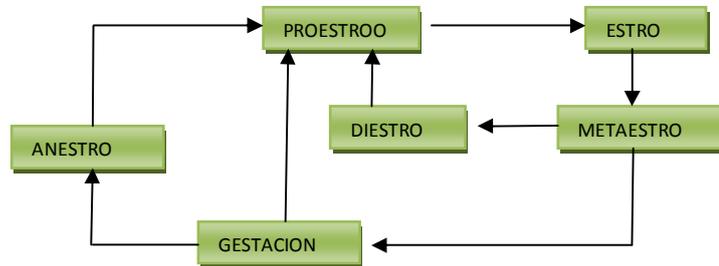
1.5. El ciclo estral de la perra

El nombre del ciclo estral deriva del latín *oistros* que significa “deseo imperioso”. (ILLERA, 1979)

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 en las perras entre los 6 y los 10 meses de edad, y experimenta un nuevo ciclo ovárico cada 6 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 13 meses, siendo estos valores extremos relacionados con hembras de baja o nula fertilidad, exceptuando algunas razas (p.ej: Basenji) que ciclan de forma rutinaria cada 12 meses. (ESQUIVEL, Carlos; 1987).

Entre los 2 y los 6 años de edad las hembras son relativamente constantes tanto en la duración de su ciclo como en 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. 200Y6)

ESQUEMA 1. CICLO ESTRAL



Fuente: (ILLERA, 1979)

CUADRO 1. CICLO ESTRAL DE LA PERRA

FASE DEL CICLO SIGNO	PROESTRO	ESTRO	METAESTO	ANESTRO
Clínico	Vulva agrandada. Secreción vaginal sanguinolenta. No es receptiva al macho.	Vulva aún más dilatada. Acepta al macho. Desplaza la cola	Gestación o Pseudogestación Rechaza al macho.	Ningún signo. Indiferencia hacia el macho.
Morfológico	Genitales congestionados. Desarrollo foliculo ovárico.	Genitales congestionados Ovulación. Cuerpo lúteo desarrollado. Proliferación endometrial.	Cuerpo lúteo activo. Proliferación endometrial. FSH. LH.	El endometrio se descama y repara
Hormonal	Estrógeno.- se eleva y alcanza el pico Progesterona.- Se eleva ligeramente. Feromonas.- aumento creciente. Aumenta el FSH. Aumenta la LH	Estrógeno baja antes de la ovulación. Progesterona se eleva.	Progesterona alcanza el pico y declina. Sube la prolactina.	Ningún cambio. Estrógenos se elevan ligeramente próximo al Proestro

Fuente: (MERGAR, 2011)

1.5.1. 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 atracción de perros machos. Este no mermita que el macho le monte. El cambio físico de la vulva está edematosa y típicamente hay una descarga vaginal serosanguinolenta que se origina en el útero. En el examen vaginoscópico muestra una vagina suave, rozada y edematosa. El lumen vaginal a menudo es difícil de visualizar. (CUNNINGHAM, 2003)

Durante este periodo 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 del nivel de progesterona que inhibía su liberación; precisamente en los primeros días del proestro. (ILLERA, 1979)

1.5.2. 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 cobertura. Para detectar se pasa la mano por la zona lumbar de la perra o por la simple proximidad de un macho, la hembra ladea 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. (ALVA, 2007)

1.5.3. 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. (MARTÍNEZ. 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, 2003)

1.5.4. Anestro

Es el periodo de involución uterina. En una perra preñada comenzaría con el parto y finalizaría 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. (ALVA, 2007)

1.6. La fecundación monta natural

Antes de decidir criar con nuestros perros, debemos comprobar que están en perfecto estado de salud tanto el macho como la hembra. En el macho se descartarán problemas anatómicos en pene, prepucio, testículos y escroto, así como un tacto rectal

para palpar la próstata. De forma idónea, se recolectaría semen del macho para valorar su idoneidad antes de la monta. (ILLERA, 1979)

En la hembra se evaluará, además de su estado físico y peso, la conformación de la vulva y alteraciones o masas en las mamas. Tanto el macho como la hembra deben estar correctamente desparasitados interna y externamente, vacunados y exentos de enfermedades infectocontagiosas. Hay que descartar enfermedades infecciosas como la Leishmaniosis, Ehrlichiosis, Brucelosis, Filariosis, etc., y endocrinas como por ejemplo hipotiroidismo si no se ha hecho anteriormente. (MARTÍNEZ. 2013)

1.6.1 Cortejo

La conducta de cortejo comprende el olfateo por el macho del hocico, orejas, cuello, flancos y área vulvar de la hembra mientras ella hace lo mismo si está en estro. Si está en proestro la hembra va a rechazar al macho que se aproxime, sentándose, gruñéndole, huyendo de él e incluso mordiéndole. Pero supongamos que es el momento ideal. Ante la presencia del macho, la perra en estro adopta una actitud característica donde el principal signo es la elevación y ladeo de la cola y la exposición de la vulva. A menudo se observan contracciones en los músculos perineales y rectales en la perra. (ROOT, 2005)

1.6.2 La copula

El macho inicia su estimulación como consecuencia del olor de las feromonas producidas por la vagina y las glándulas anales de la perra. Se inicia la erección del pene y el macho *monta* a la hembra e introduce el pene dentro de la vagina (*penetración*) mediante movimientos rítmicos que llamamos *acometida*. Durante este periodo se eyacula la primera fracción de semen o *fracción uretral*, líquida claro libre de espermatozoides. A continuación el perro se gira, lo que conocemos como *volteo*, momento en el que se completa la erección. Después el perro desmonta, quedando unido a la perra en sentidos opuestos. Es el *abotonamiento* en esta fase tiene lugar la

emisión de la tercera fracción del eyaculado (*fracción prostática*) que es clara y pobre en espermatozoides. Esta fase puede durar entre 20 y 60 minutos hasta que el glándula se relaja y el perro se *desabotona*. Hasta aquí llegaría el relato de una monta natural sin más control que el de los propietarios de los perros que se aparean. En muchos casos se produce una gestación normal, con un número de cachorros adecuado para la raza y no hay complicaciones en el parto. Pero en un porcentaje importante de gestaciones hay camadas con un número muy bajo de cachorros – a veces solo uno o dos – debido a que la monta no se ha producido en el momento óptimo. (ROOT, 2005)

1.7. Gametogénesis

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 a una fase de crecimiento y luego a una fase de maduración. (ILLERA, 1979)

1.7.1. Fisiología reproductiva del macho

El proceso fisiológico de producir espermatozoides (espermatogénesis) está muy relacionada con la producción de hormonas esteroideas (esteroidogénesis), los andrógenos y el estradiol, pero se realizan en diferentes áreas del testículo. La espermatogénesis tiene lugar en los compartimientos localizados dentro de los túbulos seminíferos a través de las células de Sertoli, en ellos se encuentran en la parte

basal células germinales en etapa de espermatogonias en división mitótica, mientras que en la sección adluminal de los túbulos contiene espermatocitos primarios en división meiótica que darán a lugar a espermatocitos secundarios y espermáticas. La síntesis de hormonas esteroideas, se produce en el compartimento de tejido intersticial formados por células de Leydig en el testículo. (SEQUERA;2003)

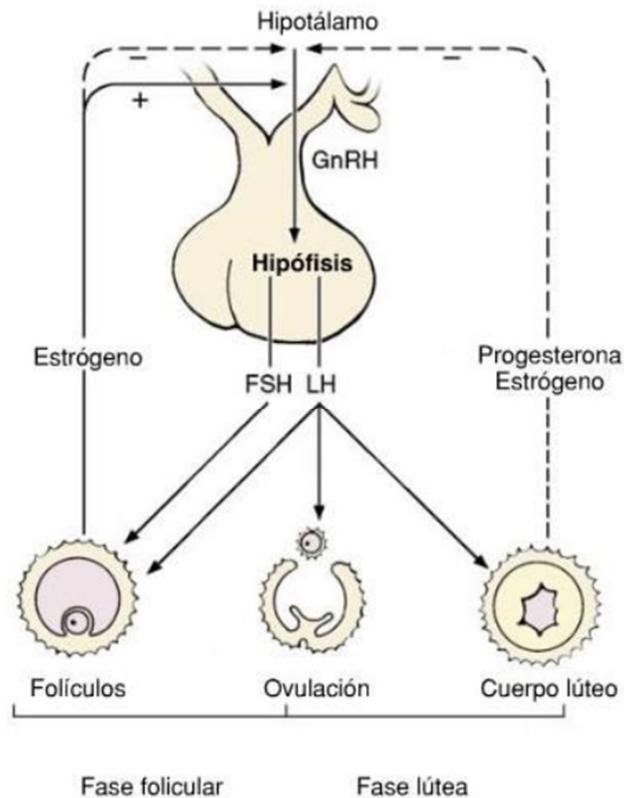
. Estas células, influenciadas por la acción de la LH, producen entre otras hormonas de tipo esteroide la testosterona, hormona esencial para el desarrollo de las características sexuales secundarias, comportamiento normal, función de las glándulas accesorias, producción de espermatozoides y el mantenimiento del conducto. (WANKE, 2006)

1.8. Endocrinología del macho

La fisiología reproductiva del perro se controla a través del sistema endocrino por medio de la secreción y acción de dos hormonas gonadotropicas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculo estimulante (FSH) ,ambas secretadas por la hipófisis anterior ,gracias a un mecanismo de acción positiva de hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH) las cuales son secretadas de forma episódica desde el hipotálamo ,de tal manera que la adenohipofisis al recibir esos estímulos ,se unen a receptores específicos en las membranas plasmáticas de las células gonadotropas liberando LH (GnRHLH) y FSH. (GnRHFSH). (CRIANZA CANINA,2013).

De igual manera la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) está sometida a un control negativo de la testosterona, dihidrotestosterona y el estradiol, en la que intervienen de manera sincronizada el hipotálamo- hipófisis-testículos. (ROOT. 2005)

ESQUEMA 2: EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TESTÍCULOS



Fuente: (SEQUERA; 2003)

La producción de espermatozoides está influenciada por la acción de la FSH sobre las células de Sertoli y controlada (feed back negativo de FSH) por la hormona inhibina y la producción de testosterona por la LH y de manera sinérgica de la prolactina actuando sobre las células de Leydig y controlada por la proteína ligadora de andrógenos (ABP) que se sintetiza en las células de Sertoli. Para que las células de Sertoli funcionen normalmente en la producción de gametos, requieren que las concentraciones de testosterona sea considerablemente más elevada a nivel local en el testículo que lo que se requiere para el mantenimiento de las características sexuales secundarias, comportamiento sexual etc. Que es a nivel periférico o general. (ROOT, 2005)

CUADRO 2. LAS HORMONAS REPRODUCTIVAS Y SUS FUNCIONES EN EL PERRO

Hormona	Lugar de liberación	Función
GnRH	Hipotálamo	Liberación de FSH y LH por la hipófisis anterior
LH	Hipófisis anterior	Actúa en las células de Leydig para estimular la síntesis de andrógenos-estradiol
FSH	Hipófisis anterior	Actúa en las células de Sertoli para estimular la espermatogénesis
Testosterona	Células de Leydig	Actúa en las células de Sertoli para estimular la espermatogénesis, en la retroalimentación negativa en el hipotálamo e hipófisis anterior para el control de la liberación de GnRH y gonadotropinas
Inhibina	Células de Sertoli	Retroalimentación negativa en la hipófisis anterior para el control de la liberación de FSH
Activina	Células de Sertoli	Retroalimentación positiva en la hipófisis anterior para el control de la liberación de FSH
Prolactina	Células de Leydig	Regula la producción de testosterona
Proteína liberadora de andrógenos (ABP)	Células de Sertoli	Aumenta la testosterona en los túbulos seminíferos o en el epidídimo

Fuente (CRIANZA CANINA, 2013)

1.9. DESARROLLO DE LAS CELULAS 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:

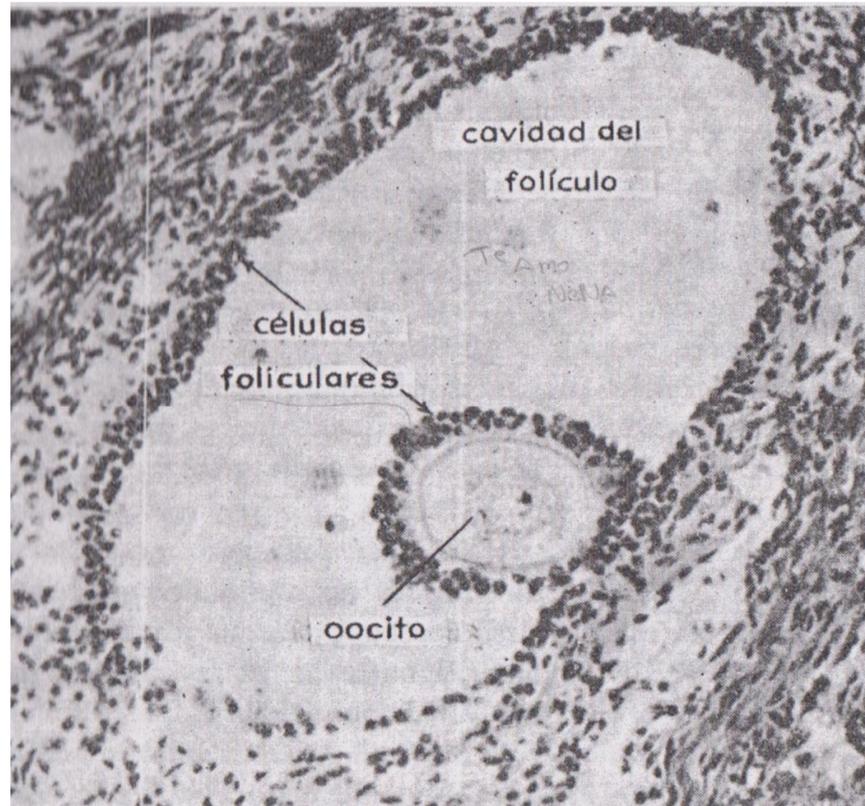
- **Proliferación:** Es una etapa fetal, mitótica en la que se forma un número determinado de ovocitos primarios que más tarde van a cumplir una función, pero muchos de ellos desaparecen al momento del nacimiento. (DE LOS REYES,2011)
- **Crecimiento:** En esta fase el ovocito aumenta de tamaño, se forma la zona pelúcida, células de la granulosa y células de la teca, los óvulos migran al interior del ovario. Esta es una fase mitótica 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 meiotica da origen al ovocito secundario y la eliminación del primer cuerpo polar. Aquí se lleva a cabo la ovulación. La segunda división meiotica se activa por el nemaspermo en el ovulo y produce al cigoto y al segundo cuerpo polar.(HERNANDEZ, 2010)

1.9.1 Crecimiento de los oocitos

En muchos grupos de animales, notablemente en los cordados, 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. 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**. (PRECOSTI, 1999)

FIGURA1. FOLÍCULO DE GRAF EN EL OVARIO DE UNA PERRA.



Fuente: (PRECOSTI, 1999)

1.9.2. 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.(AVILA, 2013)

La maduración de los ovocitos puede presentarse hasta 2 o 3 días después de la ovulación o 4 a 5 días después de la onda de LH. La vida fértil de los ovocitos maduros puede ser de 2 o 3 días, por lo que las montas durante el estro, 7 a 8 días después 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 parto es de entre 55 y 57 días entre la cruce y el parto. 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 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. (PRECOSTI, 1999)

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 sólo han sido estudiados en relación al tiempo de una cruce 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. (AVILA, 2013)

1.9.3. Clasificación de los ovocitos

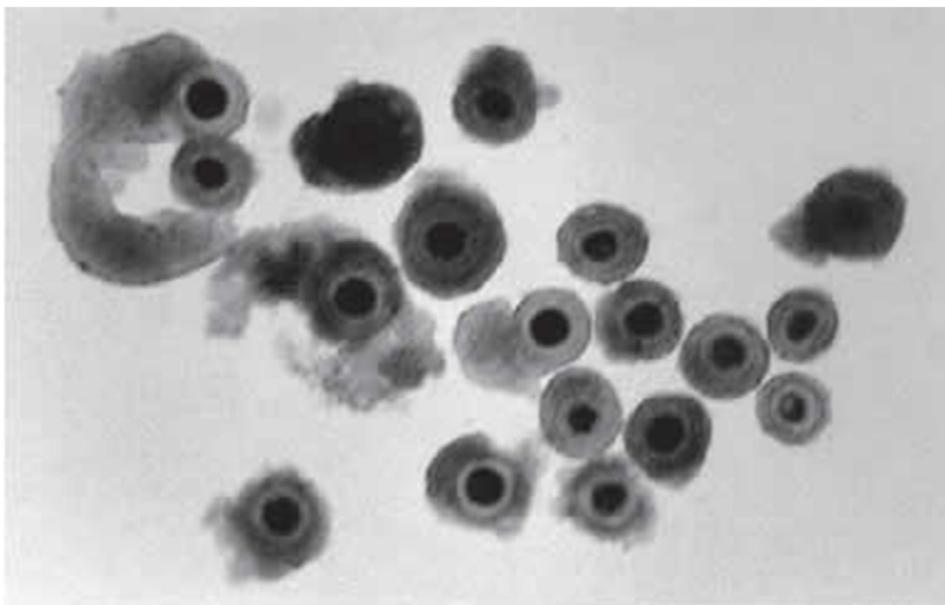
En una investigación realizada en gatos en el laboratorio de la producción en Vitro se toma las siguientes categorías de Wood y Wildt (1997) para un buen entendimiento en los resultados. Los ovocitos fueron clasificados bajo un aumento de 40X como aptos (categorías I y II) y no aptos (categorías III y IV) para la MIV, basándose en las características de las células del *cumulus oophorus* y corona radiada y la homogeneidad del citoplasma, tal como lo describen (WOOD Y WILDT 1997).

CUADRO 3. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICA DE LOS OOSITOS

CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICA
Ovocitos categoría I (excelentes)	Presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 o más capas compactas del <i>cumulus</i> .
Ovocitos categoría II (buenos)	Presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa pero menos de 5 capas del <i>cumulus</i> .
Ovocitos categoría III (regulares)	Presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del <i>cumulus</i> presentes son menos compactas.
Ovocitos categoría IV (malos)	Presentan citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado y las células de la corona y del <i>cumulus</i> se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad

Fuente: (SÁNCHEZ, 2003)

FIGURA 2. OVOCITOS DE GATA CLASIFICADOS COMO APTOS PARA MADURACIÓN IN VITRO (CATEGORÍAS I Y II)



Fuente: (RECOSTI, 1999)

FIGURA 3. OVOCITOS DE GATA CLASIFICADOS COMO NO APTOS PARA MADURACIÓN IN VITRO (CATEGORÍAS III Y IV)



Fuente: (PRECOSTI; 1999)

1.10. MARCO CONCEPTUAL.

En el tratamiento gonadotrófico con FSH sobre las características foliculares y ovocitarias de gatas adultas, y comparar dos esquemas de administración de FSH en términos del número de ovocitos potencialmente aptos para MIV. Usando veinte gatas adultas, aleatoriamente, se formaron tres grupos de tratamiento. Grupo SC (n=7) 5 mg/ día de FSH por 4 días, vía subcutánea; Grupo IM (n=6) 2 mg/día de FSH por 5 días, vía intramuscular y un Grupo Control (n=7).(SANCHEZ;2003)

Las gatas fueron ovariectomizadas y se realizó recuento, medición de folículos y recuperación de ovocitos. Los folículos fueron agrupados en dos categorías: < 2 mm y = 2 mm (considerados como preovulatorios). El tratamiento gonadotrófico aumentó

($P < 0.05$) el número total de folículos y número de folículos = 2 mm, comparado con el grupo control, independiente del esquema de administración de FSH. El tratamiento gonadotrófico, también aumentó ($P < 0.05$) el número total de ovocitos recuperados y el número de ovocitos aptos para MIV, comparado con el grupo control, independiente del esquema de administración de FSH. Las tasas de recuperación de ovocitos totales y ovocitos aptos para MIV fueron superiores ($P < 0.05$) en folículos = 2 mm versus folículos < 2 mm. (SÁNCHEZ, 2003)

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Es necesario describir a breves rasgos el lugar donde se ejecutó la práctica y el desarrollo de la investigación; por lo tanto en este capítulo es necesario describir los materiales y métodos utilizados, también se profundizará sobre las unidades experimentales que se llevaron a cabo consecutivamente en la investigación, como sus diseños experimentales y el análisis estadístico aplicado que nos facilitó su desarrollo y finalización del ensayo.

2.1. Ubicación del experimento

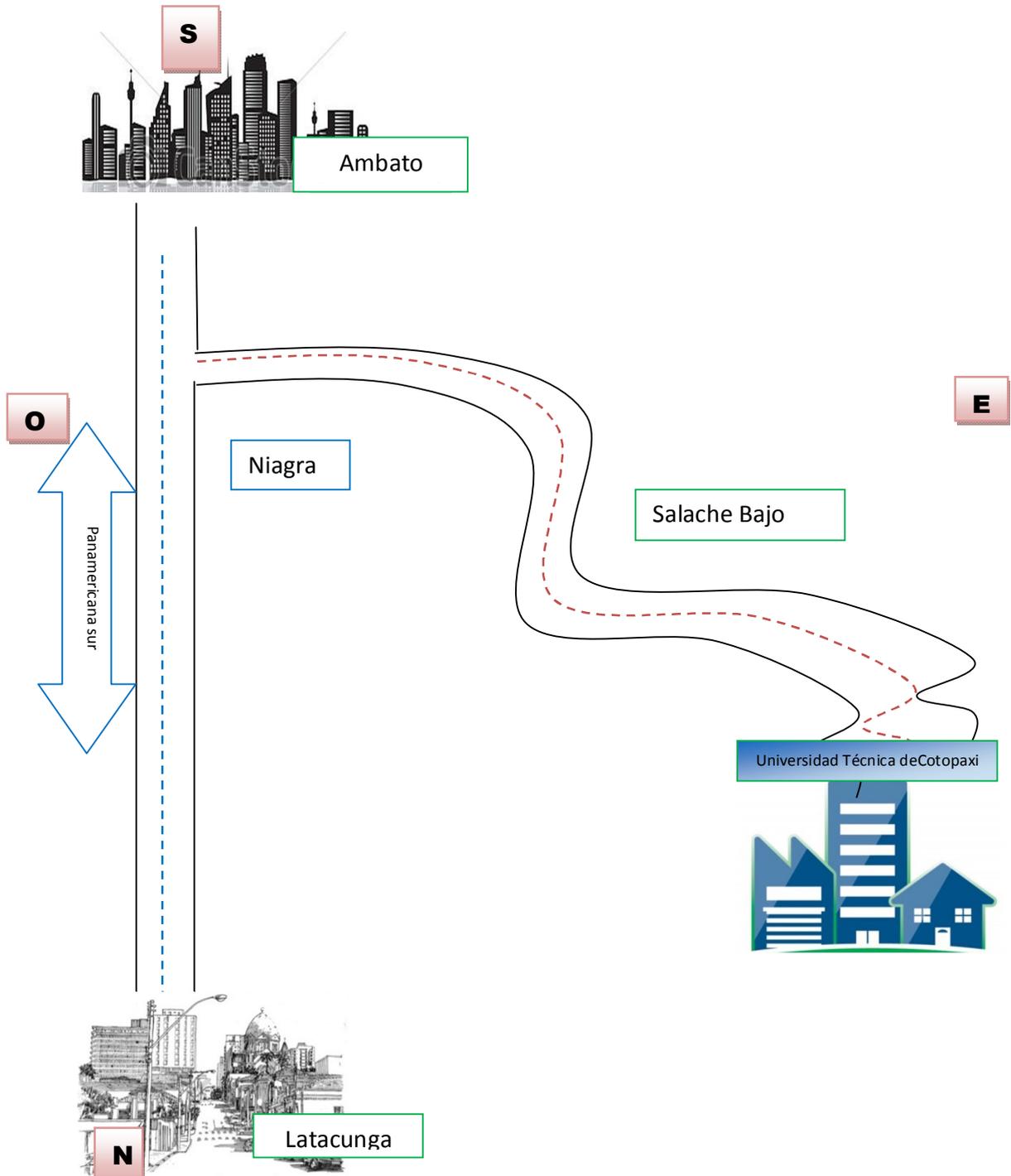
2.1.1 Situación Política

- **Provincia:** Cotopaxi.
- **Cantón:** Latacunga.
- **Parroquia:** Eloy Alfaro.
- **Barrio:** Salache Bajo.

2.1.2 Situación Geográfica

- **Latitud:** 00° 59'47.68"S.
- **Longitud:** 78° 3'19.16"W.
- **Altitud:** 2757.591 m.s.n.

FIGURA 4. MAPA DE UBICACIÓN DONDE SE DESARROLLÓ EL ENSAYO



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

2.2. Materiales

2.2.1. Materia prima

- Ovarios funcional
- Semen

2.2.2. Materiales de Laboratorio

- Medio de maduración
- Micro pipeta
- Medio SOF
- Envase
- Medio de fertilización
- Medio de cultivo
- Percol
- holding
- Heparina
- Jeringuillas
- Caja petri
- Mandil
- Guantes de cirugía
- Mascarilla.
- Bisturí
- Microscópico
- Termo para pajuelas
- Suero fisiológico
- Diluyente amdromed
- Tubos graduados
- Tubos vacumtainer
- Pajuelas de 0.25

- Termo de nitrógeno líquido
- Nitrógeno líquido
- Tapones de pajuelas
- Microscopio
- Cámara de Neubauer o conteo

2.2.3. Materiales de oficina

- Lapiceros
- Hoja de papel bond
- Cuaderno de notas
- Cámara fotográfica
- Marcador permanente punta fina
- Borradores
- Anillados
- Empastados
- Registro
- Copias
- CDs
- Carpeta
- Computadora
- Calculadora
- Memory flash

2.3. Diseño metodológico

2.3.1 Tipo de investigación.

El tipo de investigación es de tipo descriptiva, explicativa y no experimental ya que se obtuvieron datos de acuerdo al desarrollo de la investigación

2.3.1.1. Investigación descriptiva

En las investigaciones de tipo descriptiva, llamadas también investigaciones diagnósticas. Consiste, fundamentalmente, en caracterizar un fenómeno o situación concreta indicando sus rasgos más peculiares o diferenciadores.

Describe los datos y características de la población o fenómeno en estudio, donde se obtuvieron en el laboratorio cuidadosamente los datos de ovocitos que se realizaron en la producción In vitro.

2.3.1.2. Investigación explicativa

Explica las relaciones de los eventos generando teoría y determina las causas de los eventos. No sólo persigue describir o acercarse a un problema, sino que intenta encontrar las causas del mismo. Existen diseños experimentales y NO experimental. Desde un punto de vista estructural reconocemos cuatro elementos presentes en toda investigación: sujeto, objeto, medio y fin. Se entiende por sujeto el que desarrolla la actividad, el investigador. Por objeto, lo que se indaga, esto es, la materia o el tema.

Por medio, lo que se requiere para llevar a cabo la actividad, es decir, el conjunto de Por fin, lo que se persigue, los propósitos de la actividad de búsqueda, que radica en la solución de una problemática detectada. Métodos y técnicas adecuados.

2.3.1.3. Investigación no experimental

Es aquella que se realiza sin manipular deliberadamente variables. Posibilita examinar el comportamiento de nuevas técnicas que no han sido descritas; los parámetros son descritos mediante tablas, cuadros, barras, etc Se basa fundamentalmente en la observación de fenómenos tal y como se dan en su contexto natural para analizarlos con posterioridad. En este tipo de investigación no hay condiciones ni estímulos a los cuales se expongan los sujetos del estudio. Los sujetos son observados en su ambiente natural.

2.4. Metodología

La metodología de estudio que se empleó en la investigación es de tipo no experimental ya que no especifica la naturaleza de las comparaciones que habrían de efectuarse, constituyendo además el plan general del investigador para obtener respuestas a sus interrogantes o comprobar las hipótesis de investigación.

2.5. Unidad de estudio

Para la investigación se necesitó de 5 perras, de las cuales se obtuvo 10 ovarios de animales caninos.

2.6. Metodología y técnica de investigación

Se tomó en cuenta los siguientes métodos:

- ✓ Método deductivo
- ✓ Método inductivo
- ✓ Método analítico
- ✓ Método sintético

2.6.1. Método deductivo:

La deducción va de lo general a lo particular. El método deductivo es aquél que parte los datos generales aceptados como valederos, para deducir por medio del razonamiento lógico, varias suposiciones, es decir; parte de verdades previamente establecidas como principios generales, para luego aplicarlo a casos individuales y comprobar así su validez.

Se puede decir también que el aplicar el resultado de la inducción a casos nuevos es deducción.

2.6.2. Método inductivo:

La inducción va de lo particular a lo general. Empleamos el método inductivo cuando de la observación de los hechos particulares obtenemos proposiciones generales, o sea, es aquél que establece un principio general una vez realizado el estudio y análisis de hechos y fenómenos en particular.

La inducción es un proceso mental que consiste en inferir de algunos casos particulares observados la ley general que los rige y que vale para todos los de la misma especie.

2.6.3. Método analítico:

Es aquél que distingue las partes de un todo y procede a la revisión ordenada de cada uno de sus elementos por separado. Analizar significa: Observar y penetrar en cada una de las partes de un objeto que se considera como unidad.

En la Investigación documental es aplicable desde el principio en el momento en que se revisan, uno por uno los diversos documentos o libros que nos proporcionarán los datos buscados. El Análisis es provechoso en cuanto que proporciona nuevos elementos de juicio.

2.6.4. Método sintético:

Consiste en reunir los diversos elementos que se habían analizado anteriormente. En general la Síntesis y Análisis son dos fases complementarias.

La síntesis es indispensable en cuanto reúne los elementos y produce nuevos juicios, criterios, tesis y argumentación.

2.7. Operacionalización de las variables o de las categorías fundamentales

CUADRO 5

VARIABLE INDEPENDIENTE O FACTOR EN ESTUDIO.	VARIABLE DEPENDIENTE	INDICADORES.
PIV caninos	Ovocitos colectados	Número
	Ovocitos maduros	Número %
	Ovocitos atrésicos	Número %
	Ovocitos fertilizados	Número %
	Embriones generados	Número %

Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

2.7.1. Ovocitos colectados

El número de ovocitos colectados se realizó por cada ovario donde se obtuvo mediante un conteo directo.

2.7.2. Ovocitos maduros

El número de ovocitos maduros se obtuvo mediante el conteo directo.

El porcentaje de ovocitos maduros se lo obtuvo mediante la siguiente fórmula

$$(\%) \text{ de ovocitos maduros} = \frac{\text{Ovocitos maduros} * 100}{\text{Ovocitos colectados}}$$

2.7.3. Ovocitos atrésicos

El número de ovocitosatrésicos se obtuvo mediante el conteo directo.

El porcentaje de ovocitosatrésicos se lo obtuvo mediante la siguiente fórmula

$$(\%) \text{ de ovocitosatrésicos} = \frac{\text{Ovocitosatrésicos} * 100}{\text{Ovocitos colectados}}$$

2.7.4. Ovocitos Fertilizados

El número de ovocitos fertilizados se obtuvo del número de ovocitos maduros.

El porcentaje de ovocitos fertilizados se lo obtuvo mediante la siguiente fórmula

$$\% \text{ de ovocitos fertilizados} = \frac{\text{Ovocitos fertilizados} * 100}{\text{Ovocitos maduros}}$$

2.7.5. Embriones generados

El número de embriones generados se los obtuvo de la totalidad del número de ovocitos fertilizados

El porcentaje de embriones generados se lo obtuvo mediante la siguiente fórmula

$$\% \text{ de embriones generados} = \frac{\text{embriones generados} * 100}{\text{Ovocitos fertilizados}}$$

2.8. Manejo del ensayo

El estudio de fertilización in vitro de embriones en caninos se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria y de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Técnica que consiste en observar atentamente el fenómeno, para tomar información y registrarla para la interpretación de los resultados.

Este tema de tesis se llevó con mucho cuidado en los resultados obtenidos en el laboratorio, ya que de ello depende, la seriedad de la investigación y posteriormente servirá como guía para futuras investigaciones a quienes se dedique a la carrera en pequeñas especies.

Fue el número de ovocitos que se puedan recolectar de 5 perras esterilizada de las que se obtendrá 10 ovarios, dando un número estimado de 125 ovocitos en total.

2.8.1. Metodología práctica empleada

- Preparación del laboratorio
- Obtención de los ovarios en animales caninas
- Lavado de ovarios
- Obtención de ovocitos
- Desarrollo de la práctica

2.8.1.1. Preparación del laboratorio

En el laboratorio se preparó todos los materiales que se utilizaron, verificando que se encuentren limpios y desinfectados, al igual que el medio donde se desarrolló el experimento, ya que se encuentra con todos los medios de bioseguridad, necesarios para la práctica.

2.8.1.2. Obtención de los ovarios en animales caninos

La recolección de ovarios se obtuvo con la ayuda de las clínicas Veterinarias (Quito-Latacunga) y Protección Animal Ecuador (PAE), donde se recolectó en un frasco estéril y con suero fisiológico llevando inmediatamente al Laboratorio de biotecnología de la Carrera de Medicina Veterinaria en la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Mientras menor sea el corto tiempo de llegada al laboratorio mayor es la probabilidad de obtener buenos resultados con la práctica.

2.8.1.3. Lavado de ovarios

En el laboratorio, con la vestimenta adecuada, bajo condiciones asépticas se lavaron los 10 ovarios de 0.5 mm de diámetro tres veces con suero fisiológico 30°C para retirar material contaminante, sangre y detritus tisulares.

2.8.1.4. Obtención de ovocitos

Todos los ovarios seleccionados y limpios se los realizó con la técnica sagital con un bisturí, permitiendo visualizar a cada uno de los folículos y a estos folículos con cortes lentos y cuidadosos se le extrajo los 125 ovocitos en una caja Petri plástica esteril donde ya contenía solución a base de holding plus en pequeñas cantidades.

2.8.2. Desarrollo de la práctica

Una vez que se colectó los ovocitos se siguieron los siguientes pasos en el laboratorio, tomando en cuenta sus técnicas.

2.8.2.1. Protocolo para la producción de embriones

La técnica a utilizar para la investigación es BOONCHER ANIMAL (HUELS).

- 1) Maduración in vitro de ovocitos
- 2) Capacitación espermática
- 3) Fertilización de ovocitos
- 4) Crio conservación de los embriones

2.8.2.1.1. Maduración in vitro de ovocitos

Para ello primero se clasifica a los ovocitos por calidad y tipo para una clara investigación, permitiéndonos separar e ir evaluando su forma.

2.8.2.1.1.1. Clasificación de los ovocitos:

Para esta clasificación es importante el esteroscopio donde se realizó un lavado con holding plus extrayendo con una micro pipeta a los ovocitos no aptos para la investigación de los ovocitos aptos.

A los ovocitos aptos se los separo en una caja peri que tenía seis micro gotas de solución holding por separados clasificando a los oocitos de distinta calidad tipos A, B y C.

- a. **Tipo A:**Corresponde a un ovocito con células del Cumulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente.
- b. **Tipo B:** Tiene capas múltiples del cumulas (De 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras.

- c. **Tipo C:** Son ovocito alterado en su desarrollo, con cambios notorios de degeneración: citoplasma vacuolar o fragmentado, cromatina dispersa y aumento marcado del espacio perivitelino.

2.8.2.1.1.2. Categorización en la cámara flujo laminar

Dentro de la cámara de flujo laminar se trabajó de forma extraordinaria y muy aséptica ya que es esencial dentro del protocolo para el trabajo investigativo.

A los ovocitos de buena calidad escogidos en la cámara laminar mediante el estéreo microscopio se los lavo con holding para asegurarnos que no exista partículas que impidan unos buenos resultados a estos oocitos se los separo en una caja petri de vidrio categorizándoles.

Dando como resultado:

- ✓ **Tipo A: ovocitos**
- ✓ **Tipo B: ovocitos**
- ✓ **Tipo C: ovocitos**

Obteniendo un total de ovocitos clasificados.

2.8.2.1.1.3. Medio de maduración

Cuando ya estuvieron lavados se los separo en micro cajas petri con una gota de aceite mineral y una gota de medio de maduración en el cual se ubicó los ovocitos para su maduración.

2.8.2.1.1.4. Llenado al vacío

Se colocó la micro caja Petri con la muestras seleccionadas dentro de una funda transparente de 40 x 60 con auto cierre hermético a este se lo lleno de gas con el fin de proveer humedad, y sellamos completamente asegurándonos que no salga aire.

Este gas que contiene el 5% de Dióxido de Carbono, 5% de Oxígeno y 90% de Nitrógeno, para la maduración de los ovocitos.

2.8.2.1.1.5. Baño maría

La máquina baño maría debe estar a una temperatura de 38.5 °C por 24 horas y 38.5 las horas posteriores, donde se colocó la funda con las muestras bien selladas y serramos. La máquina no debe ser tocada ni abierta hasta el siguiente día, posterior a este poder abrir y tener ovocito maduros de calidad y así poder conseguir un gran porcentaje de oocitos viables al momento de la fertilización.

2.8.2.1.2. Capacitación Espermiática en caninos

2.8.2.1.2.1. Obtención de testículos

Con la ropa adecuada se extrajo los testículos del donador y fue colocado en un frasco de vidrio de boca ancha descrito anteriormente en los datos del recipiente con suero fisiológico.

En menos de 15 minutos se lo llevo al Laboratorio de Biotecnología donde se estaba llevando la investigación de los ovarios Ubicado en la Universidad Técnica de Cotopaxi en la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Mientras menor es el tiempo de llegada con los testículos mayor sobrevivencia de esperma abra.

2.8.2.1.2.2. Lavado de testículo

En el laboratorio de forma estéril se procedió a lavar el testículo con suero fisiológico de esa forma se eliminó residuos de sangre y con un papel estéril absorbente se logró

retirar residuos de sangre y suero sanguinio que se encontraba en los bordes del testículo.

2.8.2.1.2.3. Obtención de esperma

Para la extracción o lavado del semen se realizó la técnica de eslingepididimis. al utilizar esta técnica garantiza la obtención de un buen lavado y a obtener muestras de calidad y que sean viables en el trabajo de investigación .

Se realizó una incisión en la cola del epidídimo con mucho cuidado, si existe un sangrado se procedo inmediatamente a secar con el pavel absorbente cuidadosamente para que no contamine el esperma. Si se llegaría a contaminar la muestra se obtendría semen de mala calidad y traería consecuencias con la investigación. La cola del epidídimo se realizó el lavado con una solución de 1.5 ml de andromet en una caja petri estéril para así recolectar el espermatozoide posible.

2.8.2.1.2.4. Análisis microscópico de espermatozoides

Pequeñas muestras se observaron en el microscopio para ser evaluados en forma, motilidad, concentración de la muestra a utilizar en la práctica.

2.8.2.1.2.5. Centrifugación

La muestra procedi a colocar en tubos de centrifugación y posteriormente a centrifugar añadiendo 1.5 ml de percol en un porcentaje de 3ml esperma lavada.La muestra se centrifugó por 5 minutos y por segunda vez se centrifugó aproximadamente por 3 minutos consecutivos.

La muestra ya centrifugada se observó que en la base del tubo hubo concentración del esperma de calidad. .Con una micro pipeta se aspiró una pequeña cantidad de muestra centrifugada para la fertilización.

Una vez analizado se lo capacito con solución de eparina al espermatozoide por un tiempo de 15 minutos dentro de la cámara de flujo laminar sobre la plancha térmica.

2.8.2.1.3. Fertilización In Vitro

2.8.2.1.3.1 Unión de los ovocitos y los espermatozoides para la Fertilización in vitro

El espermatozoide capacitado se colocó en la cajas de los ovocitos en espera para su respectiva fertilización in vitro.

Unidos los dos se colocó en una funda transparente de 40 x 60 con cierre hermético y posterior a este se lo lleno de oxígeno para luego asegurarnos que no existe desfogue de aire y ser llevado a la máquina de Baño maría a una temperatura de 38.5°C por un tiempo de 24 horas.

2.8.2.1.4. Crio conservación de embriones

Después de las 24 horas pasadas procedimos con mucho cuidado a sacar la muestra de la máquina de baño a maría y se trasladó a la cámara de flujo laminar ya que es un ambiente libre de contaminación. Aplicamos una gota de medio de cultivo en una caja petri sobre la termocuplex a una temperatura de 38.5°C en la cual seleccionamos los embriones.

En otra caja petri realizamos la valoración y selección de los embriones en 4 gotas de holding teniendo como resultado. Observando De los 27 ovocitos fecundados 16 son de Grado I; 8 son de Grado II; 3 de son de Grado III; 0 de Grado IV de los cuales los de grado I y II son aptos para poder ser crioconcevidos.

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Detallaremos los resultados obtenidos en la investigación, los análisis estadísticos y los esquemas gráficos, tabulados por cada uno de las variables.

3.1. Número de ovocitos colectados

CUADRO N° 6 RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

Número de ovarios	10
Número de ovocitos	125

Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

En el cuadro N° 6 se observa que de 10 ovarios obtenidos de perras se obtuvo 125 ovocitos indistintamente de su calidad para maduración in vitro.

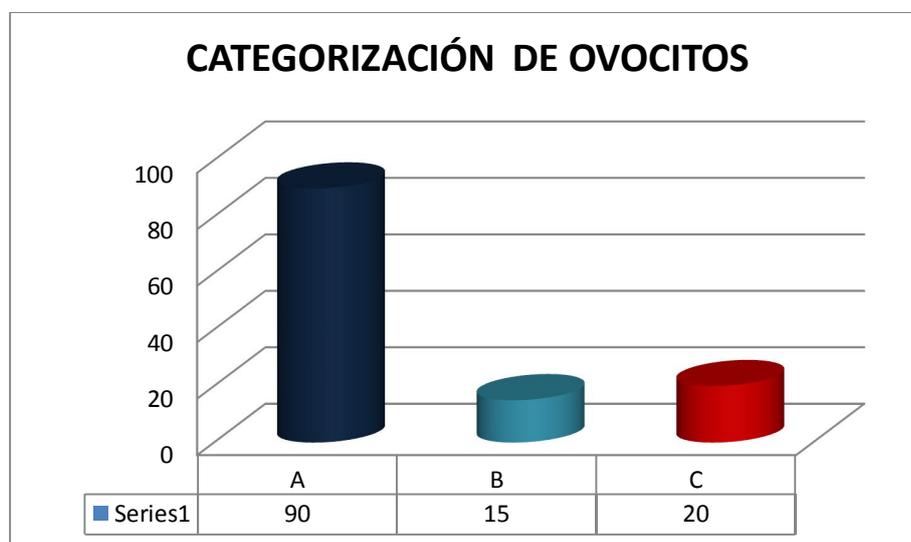
CUADRO N° 7 CATEGORÍAS DE OVOCITOS OBTENIDOS

CATEGORIAS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
A	90	72
B	15	12
C	20	16
TOTAL	125	100%

Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

GRÁFICO N° 1 CATEGORIZACIÓN DE OVOCITOS



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

Se aprecia que de los 125 ovocitos recolectados 90 ovocitos son de categoría A que representa el 72% aptos para maduración in vitro; el 15 de categoría B lo que representa en porcentaje del 12% con pequeñas imperfecciones que pueden ser usados en el protocolo de maduración pero en esta investigación se descartaron; 20 de categoría C que no son aptos para maduración in vitro. Según el Cuadro N° 7 y gráfico N° 1.

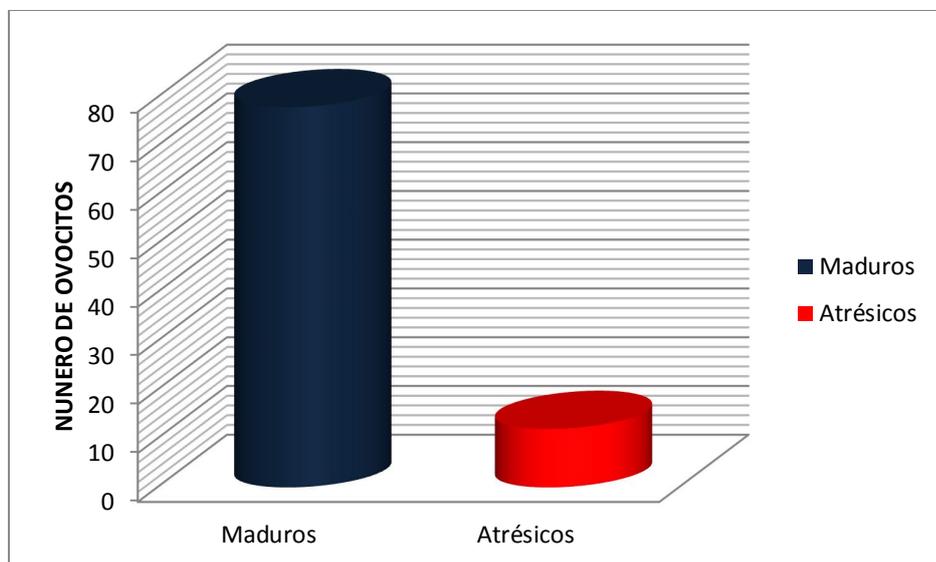
3.2 Número de ovocitos maduros y atrésicos

CUADRO N° 8 OVOCITOS MADUROS Y ATRESICOS

OVOCITOS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
Maduros	78	86.66%
Atrésicos	12	13,34%
TOTAL	90	100 %

Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

GRÁFICO N° 2 OVOCITOS MADUROS Y ATRESICOS



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

Se observa que después de la maduración in vitro de los 90 ovocitos se obtuvo 78 ovocitos maduros buenos con un porcentaje de 86,66% para ser fertilizados y 12 ovocitos atrésicos que no pudieron madurar con el 13,34% que no son aptos para fertilizarlos. Según el cuadro N°8 y gráfico N 2

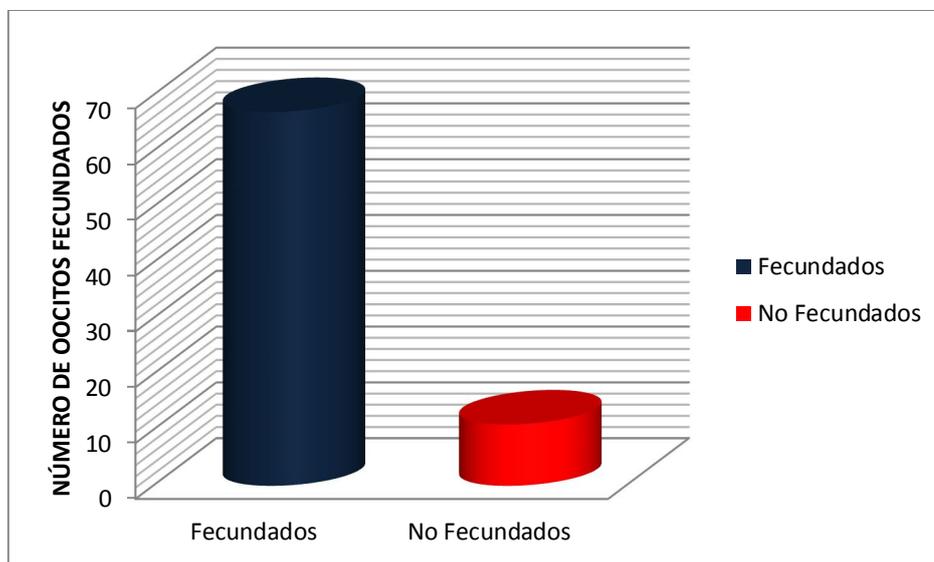
3.3 Número de ovocitos fertilizados

CUADRO N° 9 NÚMERO DE OVOCITOS FECUNDADOS.

OVOCITOS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
Fecundados	67	85,90%
No Fecundados	11	14,10%
TOTAL	78	100 %

Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

GRÁFICO N° 3 NÚMERO DE OVOCITOS FECUNDADOS



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

Se puede observar que de los 78 ovocitos fertilizados se fecundaron 67, que equivale a un porcentaje del 85,90% mientras el 14,10% no se fecundaron que equivale a 11 ovocitos. Según el Cuadro N° 9 gráfico N° 3.

3.4 Número de embriones producidos

CUADRO N° 10 NÚMERO DE EMBRIONES.

Embriones	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
Desarrollados	27	40.30%
Atrésicos	40	59,70%
TOTAL	67	100 %

Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

GRÁFICO N° 4 EMBRIONES DESARROLLADOS ATRESICOS



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

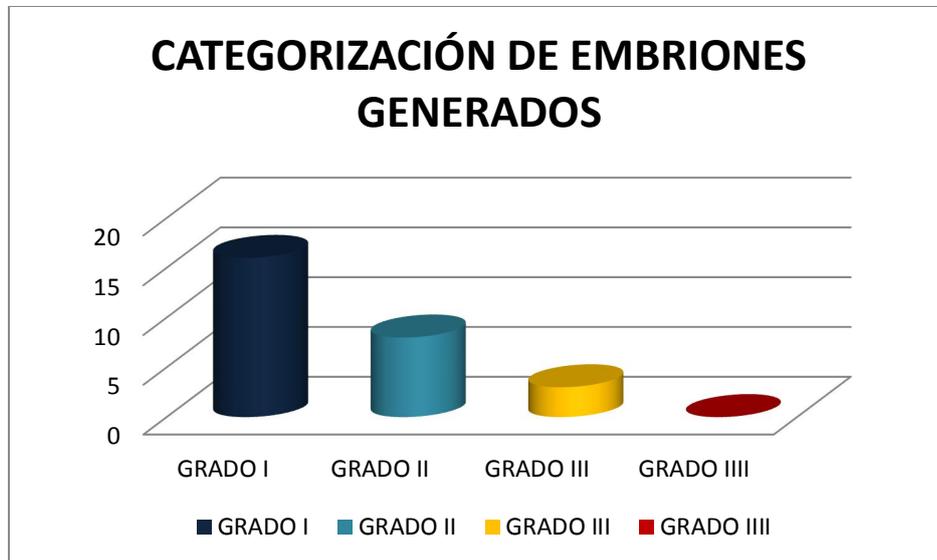
Representa que de los 67 ovocitos fecundados 27 son desarrollados, representando al 40% de embriones y de los 40atrésicos el 59,70% fueron embriones no válidos. Según Cuadro N° 10 y grafico N° 4.

CUADRO N° 11 CATEGORIZACIÓN DE EMBRIONES GENERADOS

CATEGORIAS EMBRIONES	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
GRADO I	16	59,26%
GRADO II	8	29,63%
GRADO III	3	11,11%
GRADO IIII	0	0
TOTAL	27	100%

Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

GRAFICO N° 5 CATEGORIZACION DE EMBRIONES GENERADOS



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

De los 27 ovocitos fecundados 16 son de Grado I; 8 son de Grado II; 3 son de Grado III; y 0 de Grado IV de los cuales los de grado I y II son aptos para poder ser crioconcevidos. Lo que representa el 59,26% y 29,63% respectivamente. Según cuadro 11 y Grafico 5.

CONCLUSIONES

- a. Se logró evaluar la producción invitro de embriones caprinos mediante la técnica Submarine Incubation system, en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.
- b. Se obtuvo una cantidad de 90 ovocitos Tipo A con la técnica de corte o slicing; de los cuales 78 maduraron e ingresaron a fertilización; lo que representa el 86.66%.
- c. Mediante los resultados de esta investigación se pudo obtener 27 embriones caninos de los cuales 16 son grado I ; desde el punto de vista investigativo económico hemos logrado tener este número que es muy beneficioso para las personas que se dedican a clínica de pequeñas y mantener el germoplasma de sus mascotas
- d. La técnica submarine Incubation system nos permite remplazar la incubadora por un baño maria y un cilindro de gas “que contiene 90% nitrógeno 5% Co₂ 5% de O₂”

RECOMENDACIONES

- a. Utilizar un semen de buena calidad en el momento de la fertilización, se recomienda hacer otra investigación en la cual se compare la técnica Submarine Incubation System y el equipo de incubador Co2 Inget Thermo Farma; además verificar el porcentaje de implantación de estos embriones.
- b. Se recomienda a la Universidad Técnica de Cotopaxi que con el uso del laboratorio, implementen bancos de germoplasma en donde puedan dar asistencia a los propietarios de mascotas, ya que desde el punto e vista social los caninos se le considera parte fundamental de la sociedad y por ende de los núcleos familiares.

BIBLIOGRAFIA

Referencias bibliográficas

- **CALDERON, Alanís; 1988.** Fundamentos sobre urología clínica en perros y gatos; UNAM; México, 1988; ISBN 949634408-002
- **CUNNINGHAM, James; 2003.** Fisiología Veterinaria; 2003 Tercera Edición España; ISBN 848174692.
- **DERIVAUX, J; 1961.** Fisiología de la Reproducción e Inseminación de los Animales Domésticos; Edición Saragoza- España;
- **FELMAN Y NELSON;** Endocrinología y Reproducción Canina y Felina
- **GRANJA, Verónica; 2013.** Fecundación en ganado vacuno; tesis; Quito.
- **HERNANDEZ, Verónica; 2010** y Marchant Larios Horacio; Embriología 2010; USA 103:11987-11992
- **ILERA, 1979.** Miguel; Fisiología Reproductiva; Barcelona; ISBN 795671922-X
- **JONES, E.D. y Joshua, J.O.1984:** Problemas Clínicos de la Reproducción Canina. Ed. El Manual Moderno. México, D.F. 1984
- **RECOSTI, Antonio; 1999.** Fisiología en Animales Domésticos; Quito – Ecuador; Tesis.
- **SANDOBAL, Elsa Margarita; 2007.** Inseminación Artificial Intravaginal en Caninos con semen congelado; tesis Quito- Ecuador.
- **SEQUERA, Jhoana; 2003.** Procesos reproductivos de bovino; Argentina, ISBN 8496344088.
- **WANKE, M. Magdalena; 2006.** Reproducción en Caninos y Felinos; Edición Española, ISBN 950555298-X.

Referencias virtuales

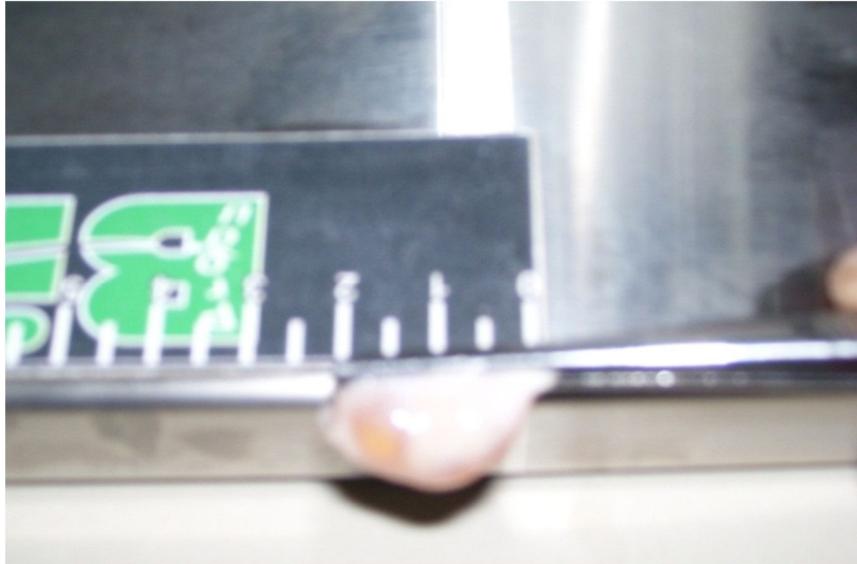
- CABREJOSSOLANO, Karina; Sistema Reproductor Femenino, Consultado el 15-12-2013;
<http://es.scribd.com/doc/58897924/14/Trompas-de-Falopio-oviductos>.
- CERVANTES, Juli; Anatomía y Fisiología Aparato Reproductor; Consultado el 02-02-2013.
<http://ebookbrowse.com/anatomia-y-fisiologia-aparato-reproductor-pdf-d419972809>
- CORDOVA, A; Anatomía y Fisiología del Aparato Reproductor Masculino y Femenino, Fisiología Dinámica. Editorial Masson. 2003. Barcelona. Consultado el 19-02-1013.
<http://www.monografias.com/trabajos-pdf/anatomia-fisiologia-aparato-masculino-femenino/anatomia-fisiologia-aparato-masculino-femenino.pdf>
- CRIANZA CANINA; 2013 Derechos Reservados, Consultado el 30- 01- 2013
<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 – 04 - 2013
<http://www.reproduccionanimal.org/site3/files/revistas/spermoval/MADURACION-NUCLEAR-Y-CITOPLASMTICA-IN-VITRO-EN-OVOCITOS-DE-PERRA.pdf>
- ESQUIVEL, Carloa; Sistema Reproductor 1987; Consultado el 18 – 04 - 2013
<http://www.uv.mx/veracruz/fmvz/files/2013/04/Anatomia-del-aparato-genital-de-perros-y-gatos.pdf>
- HERNÁNDEZ, Ana; Lda. Ciencias Biológicas ; Año 2009; Fecha 30- 01- 2013
http://es.wikipedia.org/wiki/Cabina_de_flujo_laminar

- LABORATORIO, Trifarma S.A; 2012 Av. Santa Rosa N° 390, Urb. Aurora – Ate Lima – Perú; Para MEDIFARMA S.A;Jr. Ecuador 787; Fecha 01 – 01 - 2013
http://es.wikipedia.org/wiki/Suero_fisiol%C3%B3gico
- MARTÍNEZ, B y E.; Fecundación "In Vitro" en Los Animales de Granja 2011; Consultado el 04-02-2013
<http://books.google.com.ec/books?id=lsL9chhovssC&pg=PA10&lpg=PA10&dq=fecundacion+in+vitro+perros&source=bl&ots=T2erOsAHfR&sig>
- MERGAR, Anahy; 2011; Consultado el 04-02-2013
<http://www.mergar.com/Animales/Curso%20auxiliar/Animales/Perros%20I/EI%20aparato%20reproductor%20de%20la%20hembra.pdf>.
- SÁNCHEZ, Alfonzo¹, Leonardo López Zamorano², Mauricio Silva Jiménez² y Marco Berland Olea²; Rev. Cient. (Maracaibo) v.16 n.2. Maracaibo mar. 2006; *versión impresa* ISSN 0798-2259; Consultado el 04-02-2013
<http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s0798-22592006000200005&script=sci>
- SÁNCHEZ; Evaluación de respuesta ovárica y calidad de ovocitos en gatas tratadas con hormona folículo estimulante (FSH) utilizando dos esquemas de administración; *versión impresa* ISSN 0301-732X; 23.04.2003; Consultado el 22-05-2013
<http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2003000100014>
- VALERA, Miguel Ángel; Reproducción en Perros; Año 2008; Policlínica Veterinaria Centauro; Avda. Derechos Humanos; Consultado el 01 – 03 – 2013; <http://centauroveterinarios.com/tenes/reproduccionCanina.pdf>
- HORNED; 1999; Consultado el 01 – 03 – 2013
<http://APARATO+REPRODUCTOR+DE+LA+PERRA&client=firefox-a&hs=yQv&rls=org.mozilla>

ANEXO

ANEXO 1

MEDICIÓN DEL OVARIO



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 2

SELECCION DE OVARIOS



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 3

OVARIOS SELECCIONADOS PARA LA INVETIGACIÓN



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 4

LAVADO DE OVARIO CON HOLDING



Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 5

INCISION DEL OVARIO



Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 6

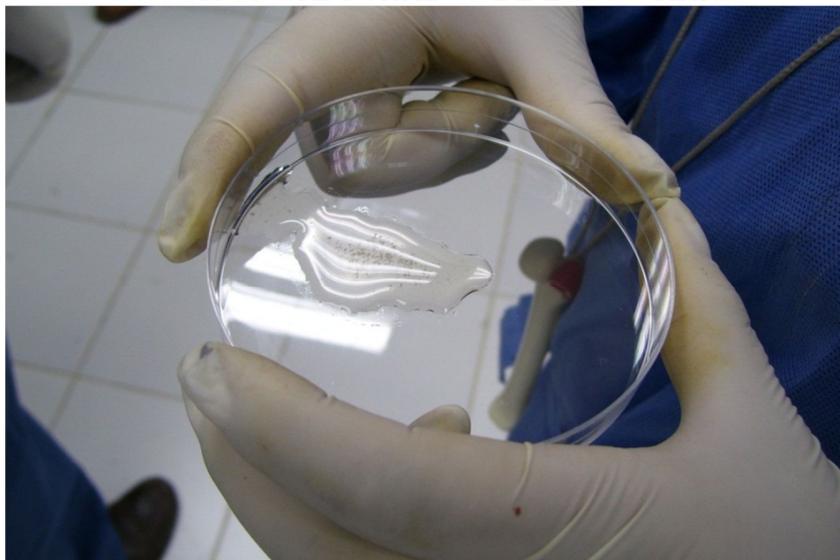
RECOLECCION DE OVOCITOS



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 7

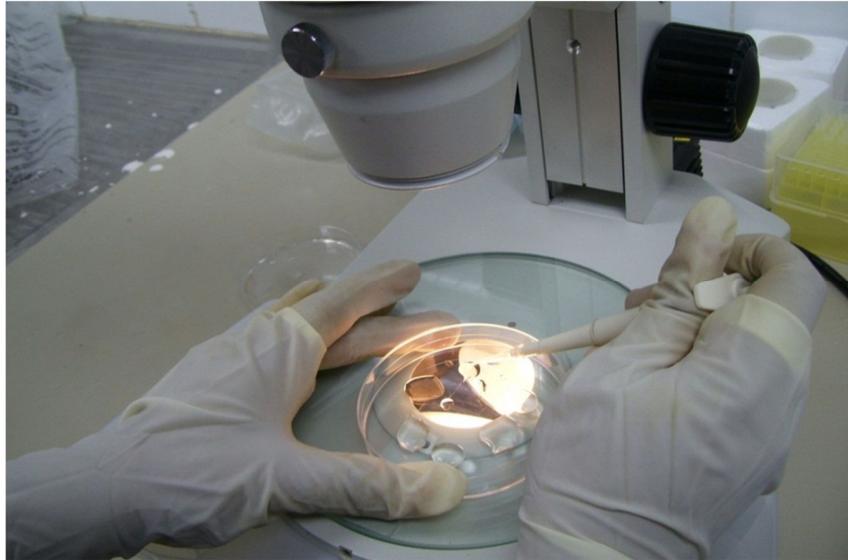
OVOCITOS CAPTURADOS DE LOS OVARIOS



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 8

SELECCIÓN DE OVOCITOS

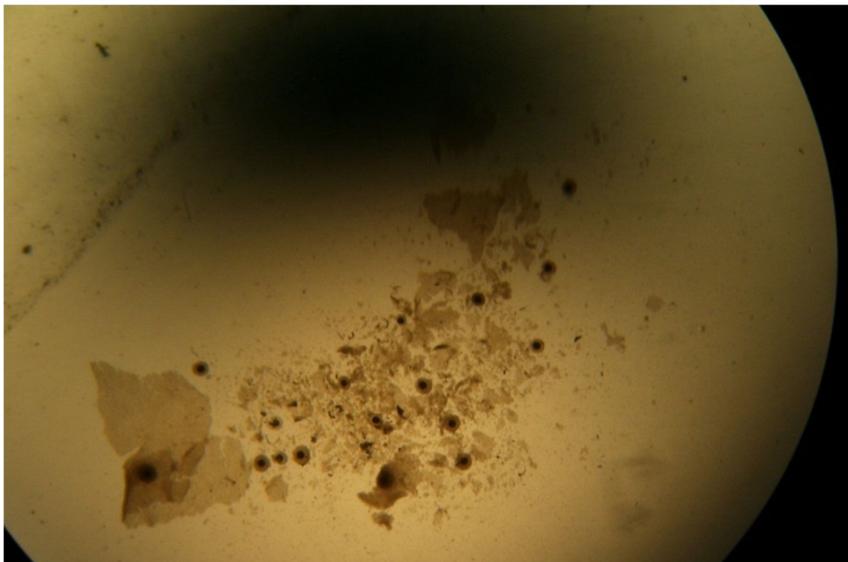


Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 9

OVOCITOS VISTOS DESDE EL ELECTRO MICROSCOPIO

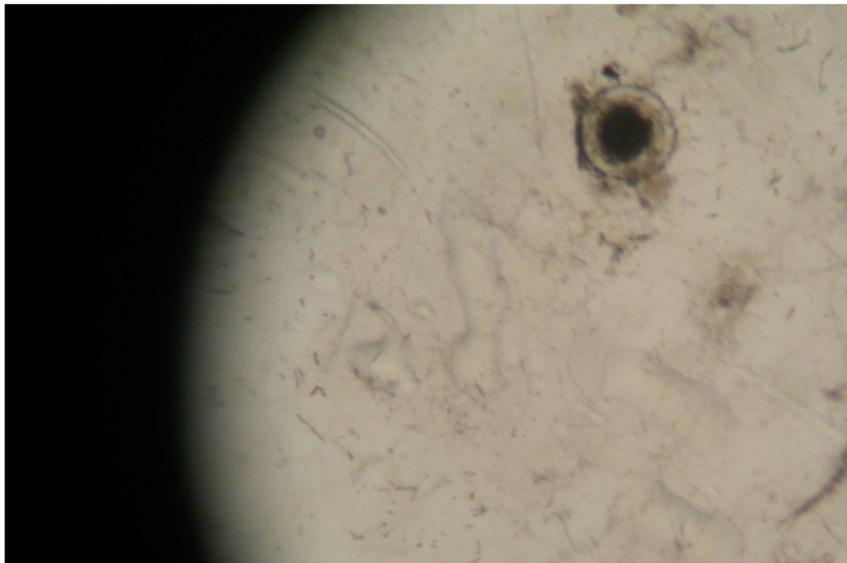


Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 10

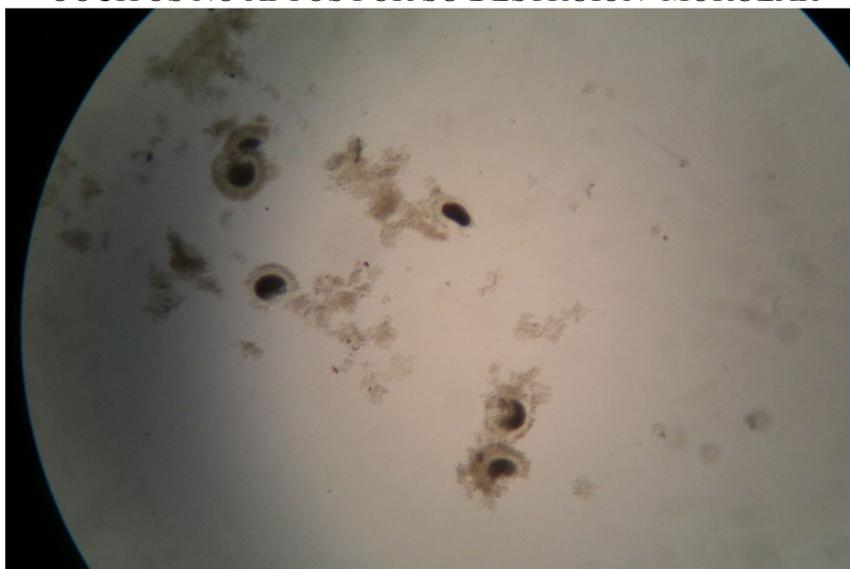
OOCITOS CON PARTICULAS ADJUNTAS



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 11

OOCITOS NO APTOS POR SU DESTRUION MORULAR



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 12

OOCITOS SELECCIONADOS PARA SER MADURADOS



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 13

LLENADO AL VACIO



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 14

MUESTRAS SELLADAS EN UNA FUNDA CON CIERRE HERMÉTICO AL VACÍO



Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 15

CÁMARA DE BANO MARIA

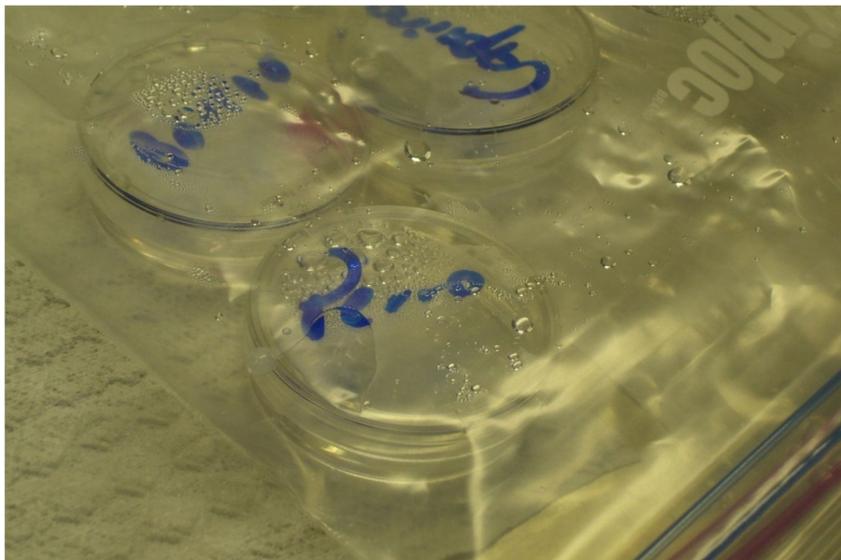


Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 16

SALIDA DE LAS MUESTRAS DE LA CÁMARA BANO MARIA

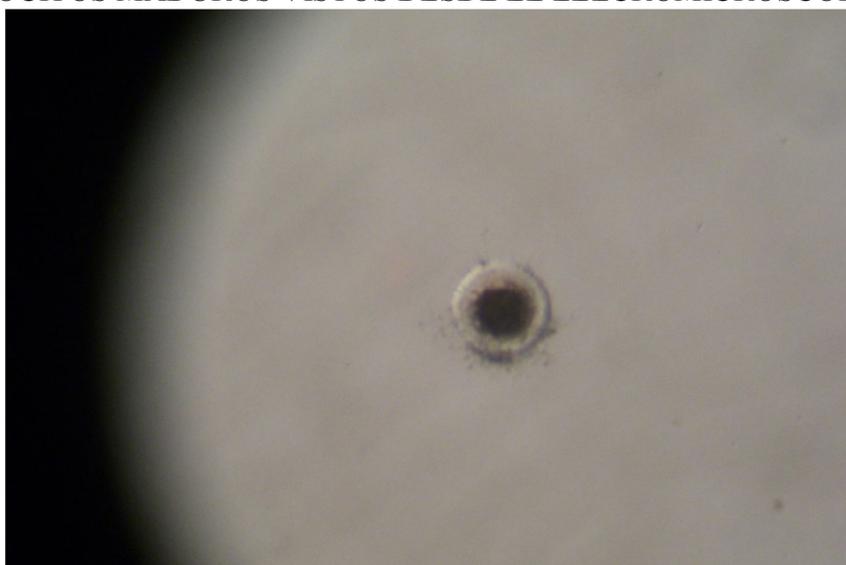


Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

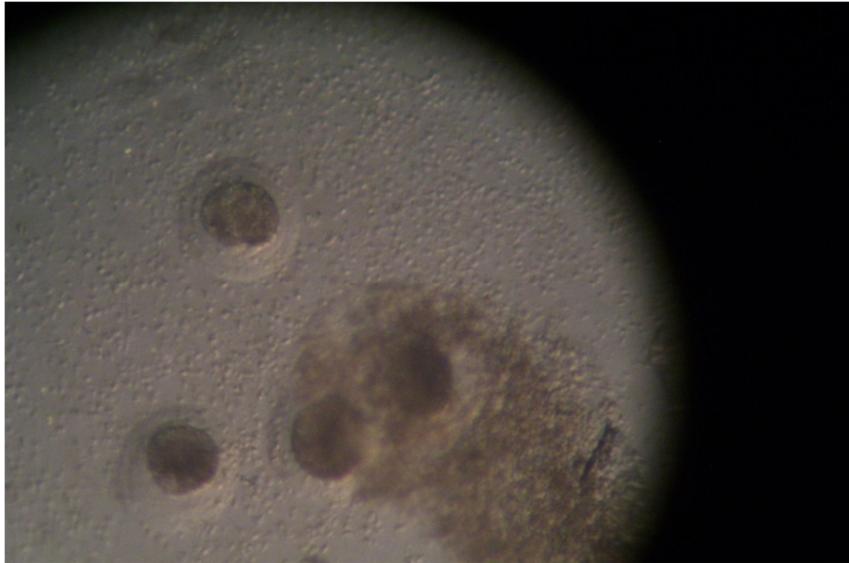
ANEXO 17

OOCITOS MADUROS VISTOS DESDE EL ELECTROMICROSCOPIO



Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 18

TERMO DE CRIOCONSERVACION PARA EL CONJELAMIENTO DE EMBRIONES



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 19

TESTICULO DE PERRO CANINO



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 20

LAVADO DE TESTICULO CON HOLDING

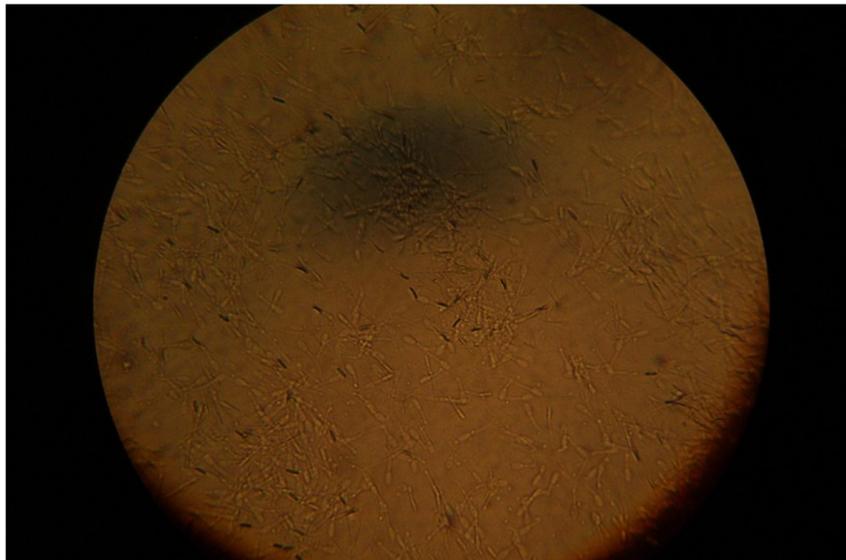


Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 21

ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS DE PERRO

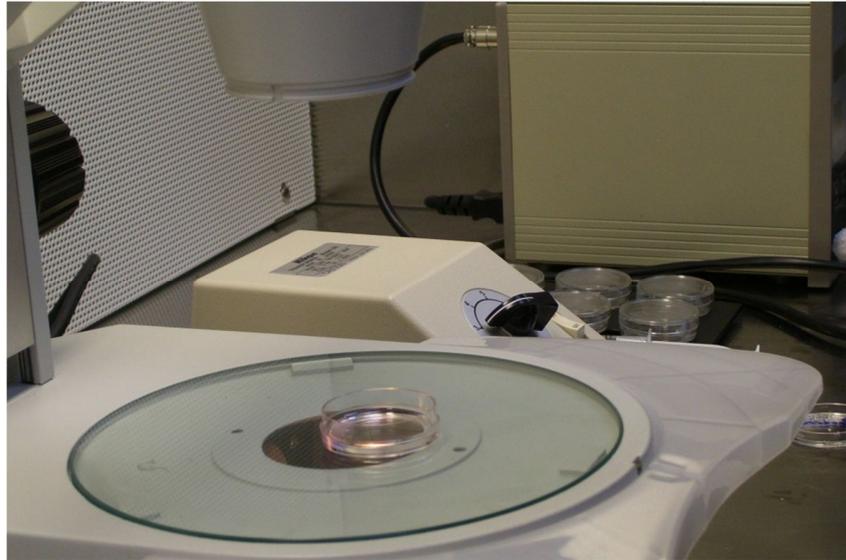


Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 22

UNION DE ESPERMATOZOIDE CON EL OVOCITO MADURO



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 23

INDICACIONES DEL TANQUE DE GAS

EC-INS-00

Linde

**RESULTADOS DE ANALISIS
GASES ESPECIALES**

LOTE # 13121203

FECHA: 12-12-2013 CILINDRO # 137818

PRODUCTO SOLICITADO: 5% CO₂, 5% O₂, BAL N₂

<u>COMPONENTE</u>	<u>CONCENTRACION</u>	<u>TOLERANCIA</u>
Dióxido de Carbono	5.0 %	+/- 10%
Oxígeno	5,0 %	
Nitrógeno	Balance	

El producto contenido en el cilindro, fue analizado y los result

Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

El producto contenido en el cilindro, fue analizado y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

<u>COMPONENTE</u>	<u>CONCENTRACION</u>
Dioxido de Carbono	4.60 %
Oxigeno	5.30 %
Nitrógeno	Balance

El producto mencionado en este certificado fue elaborado bajo las siguientes condiciones:

Tolerancia de preparación: 10%
 Nivel de confianza: 95 %
 Estabilidad garantizada: 36 Meses
 Presión mínima de uso: 3 bar SEGÚN MANUAL DE EQUIPO
 Válvula: CGA-540

Presión 150 bar

Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 24

REACTIVO, HOLDING PLUS



Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 25

MEDIO DE MADURACION



Fuente: Directa

Elaborado por: SALGUERO, Nuvia
ANEXO 26

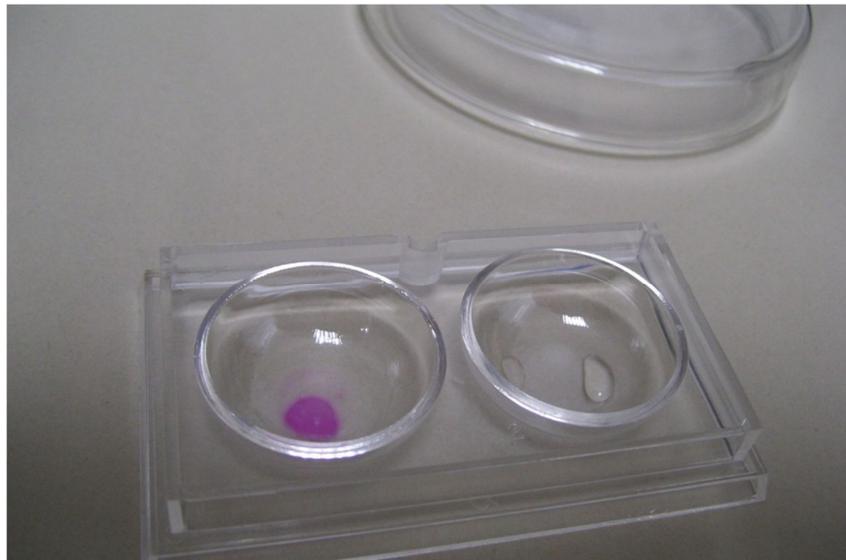
MEDIO DE FERTILIZACIÓN



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 27

MUESTRAS FERTILIZADAS



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 28

CÁMARA FLUJO LAMINAR



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 29

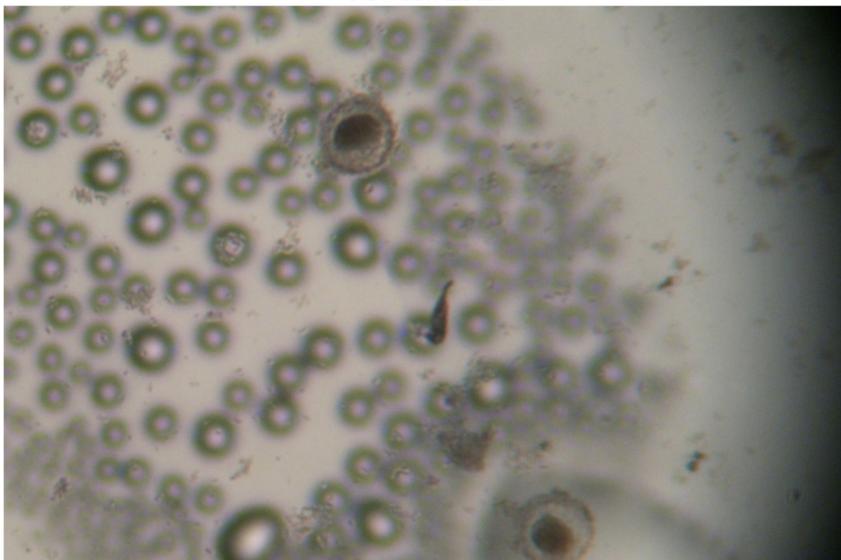
COMPROVACIÓN DE OVOCITOS FERTILIZADOS



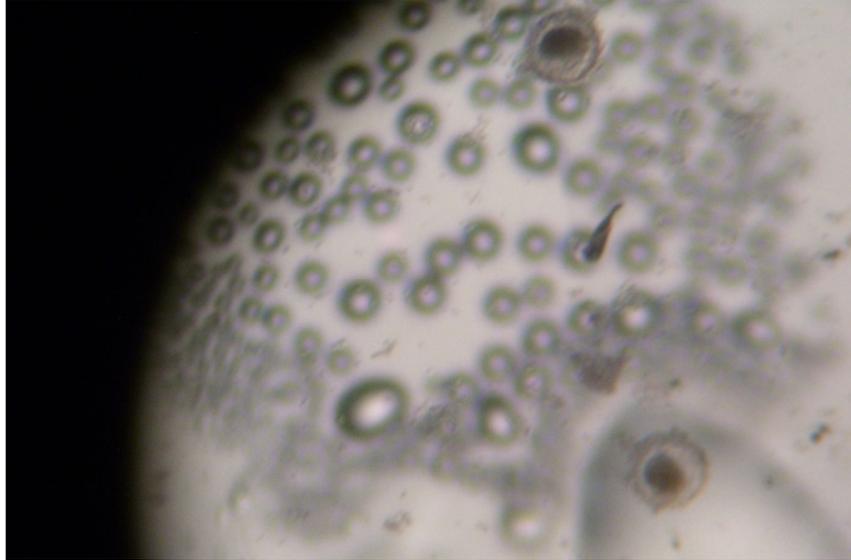
Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 30

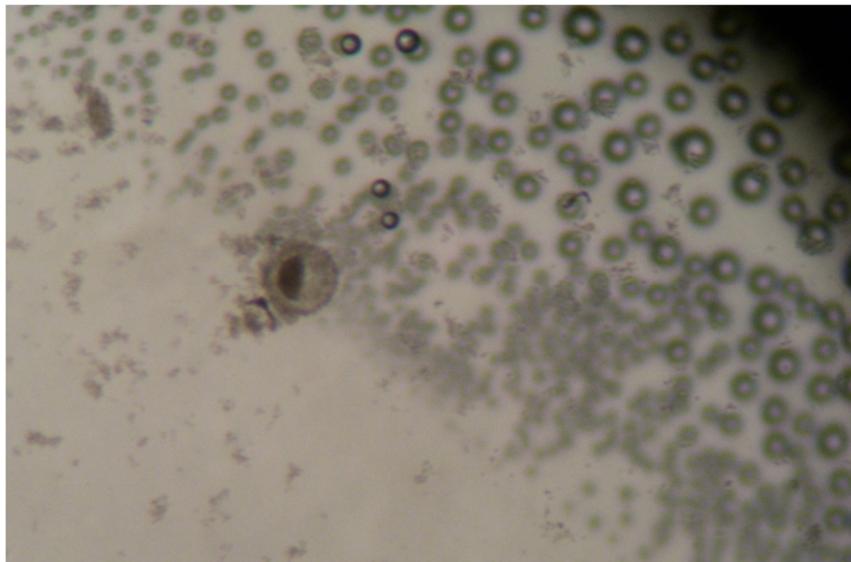
OOCITO FERTILIZADO CON SU DIVISION MORULAR



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia



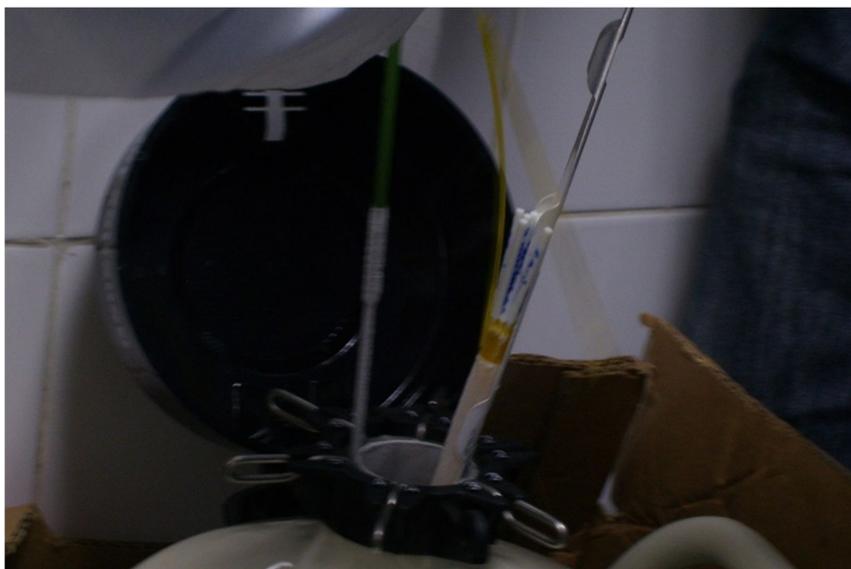
Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia

ANEXO 31

COLOCACION DE EMBRIONES EN EL TANQUE DE NITRÓGENO



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia



Fuente: Directa
Elaborado por: SALGUERO, Nuvia