

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**RECURSOS NATURALES**



**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO**  
**VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TEMA:**

“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE OVOCITOS BOVINOS CON LA  
TÉCNICA DE LA VITRIFICACIÓN EN EL LABORATORIO DE  
BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD  
TÉCNICA DE COTOPAXI”

**AUTOR:**

Lliguisupa Landin Víctor Miguel

**DIRECTOR DE TESIS:**

M.V.Z. Arcos Cristian

**Latacunga - Ecuador**

Abril - 2015

## AUTORIA

Yo, Víctor Miguel Lliguisupa Landin portador de la Cédula de Identidad N° 1723455802, declaro que el trabajo aquí descrito, la responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis es de nuestra 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.



---

Víctor Miguel Lliguisupa Landin

C. C. N° 1723455802

**Autor**

## **AVAL DEL DIRECTOR**

En calidad de director de tesis de grado titulada **“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE OVOCITOS BOVINOS CON LA TÉCNICA DE LA VITRIFICACIÓN EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”** presentada por el estudiante Víctor Miguel Lliguisupa Landin, portador de la Cédula de Identidad N° 1723455802 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.



Dr. Cristian Arcos Mg.

Director de tesis

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

En calidad de miembros del tribunal de la tesis de grado titulada, **“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE OVOCITOS BOVINOS CON LA TÉCNICA DE LA VITRIFICACIÓN EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”** Propuesto por el egresado, Víctor Miguel Lliguisupa Landin, como requisito a la obtención del grado de Médico Veterinario Zootecnista de acuerdo con el Reglamento de Títulos y Grados emitidos por la Universidad Técnica de Cotopaxi y por la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, consideramos que el trabajo mencionado reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos al acto de defensa de Tesis.

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



Dr. Edwin Pino Panchi Mg.  
**Presidente del tribunal**



Dra. Jaine Labrada Ching Mg.  
**Miembro del tribunal.**



MVZ. Blanca Villavicencio Villavicencio Mg  
**Opositor del tribunal**

## *Agradecimiento*

Agradezco a Dios por darme la vida y la sabiduría para lograr una meta muy importante en mi vida como es la de culminar mis estudios.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi, a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por acogerme algunos años de mi vida permitirme formar como persona y profesional.

Al Dr. Cristian Arcos, por haberme apoyado desinteresadamente en la realización de este trabajo en calidad de director de tesis.

A mis familiares y amigos. Que siempre estuvieron conmigo para apoyarme y darme el aliento necesario para culminar con éxito mi vida profesional.

## **DEDICATORIA.**

A mis padres Víctor Miguel Lliguisupa Ponce y Hortencia Mercedes Landin Yascaribay por sus consejos y su apoyo económico y moral pude cumplir con éxito mi profesión.

A mis hermanos Cesar, Silvia, Roció, Susana, Elena, Diana, Saúl y Cristina que siempre estuvieron en las buenas y en las malas para darme el apoyo necesario para lograr una de las metas como es culminar mis estudios.

Andrea, por su esfuerzo y su apoyo constante para formarme como profesional, porque toda la espera y los momentos difíciles que pasamos estos años en que casi desistimos, valieron la pena.

A mi hijo Keyler Sebastián Lliguisupa Ramírez, por ser mi inspiración y mi fuerza, para que yo termine mi profesión y te sientas orgulloso de mí.

## ÍNDICE

AUTORIA.....	ii
CARTA DE APROBACION DEL DIRECTOR DE TESIS ¡Error! Marcador no definido.	
CARTA DE APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL ... ¡Error! Marcador no definido.	
<i>Agradecimiento</i> .....	v
<b>ÍNDICE</b> .....	vii
Abstract.....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVOS .....	3
OBJETIVO GENERAL .....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
HIPÓTESIS.....	3
Hipótesis Alternativa. Hi .....	3
Hipótesis Nula $h_0$ .....	3
<b>CAPITULO I</b> .....	4
<b>1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA</b> .....	4
<b>1.1. ANATOMÍA Y FISILOGIA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA BOVINO</b> .....	4
1.1.1. OVARIOS .....	4
<b>1.2. CICLO ESTRAL</b> .....	5
1.2.1. Proestro o período de maduración folicular.....	7
1.2.2. Estro. ....	7
1.2.3. Metaestro o fase luteínica.....	7
1.2.4. Diestro. ....	8
1.2.5. Dinámica Folicular.....	9
1.2.5.1. Reclutamiento.....	9
1.2.5.2. Selección.....	9
1.2.5.3. Dominancia.....	9
<b>1.3. OVOGÉNESIS</b> .....	10
<b>1.4. FOLICULOGÉNESIS</b> .....	11
1.4.1. Folículos primordiales. ....	11
1.4.2. Folículos primarios. ....	12

1.4.3.	Folículos secundarios.....	12
1.4.4.	Folículos terciarios.....	13
1.5.	RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE OVARIOS.....	15
1.5.1.	De material de matadero:.....	15
1.6.	MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE OVOCITOS.....	16
1.6.1.	Recolección de ovocitos por punción.....	16
	Gráfico 3. Punción de folículos.....	16
1.6.2.	Recolección de ovocitos por corte folicular.....	17
1.7.	CALIFICACIÓN DE OVOCITOS POR CALIDAD Y MADUREZ.....	17
1.8.	MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS.....	19
1.9.	TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN.....	20
1.9.1.	CONGELACIÓN LENTA.....	21
1.9.2.	VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS.....	21
1.9.3.	MÉTODO DE VITRIFICACIÓN.....	22
1.9.3.1.	Vitrificación de óvulos y pre-embryones.....	22
1.10.	DESVITRIFICACIÓN DE OVOCITOS.....	24
1.10.1.	Desvitrificación de óvulos y pre-embryones.....	24
	CAPÍTULO II.....	26
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1.	CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR.....	26
2.1.1.	SITUACIÓN POLÍTICA.....	26
2.1.2.	SITUACIÓN GEOGRÁFICA.....	27
2.1.3.	DATOS METEOROLÓGICOS.....	27
2.2.	MATERIALES.....	27
2.2.1.	MATERIALES DE OFICINA.....	27
2.2.2.	RECURSOS TECNOLÓGICOS.....	27
2.2.3.	MATERIALES DE LABORATORIO.....	28
2.2.5.	MATERIAL BIOLÓGICO.....	28
2.3.	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	29
2.3.1.	INVESTIGACIÓN NO EXPERIMENTAL.....	29
2.3.2.	INVESTIGACIÓN DESCRIPTIVA.....	29
2.4.	MÉTODOS.....	29
2.4.1.	Método Deductivo.....	29



2.4.2.	<b>Método Científico.....</b>	30
2.5.	<b>UNIDAD DE ESTUDIO .....</b>	30
2.6.	<b>VARIABLES EVALUADAS .....</b>	30
2.6.1.	<b>CALIDAD DE LOS OVOCITOS .....</b>	30
2.6.2.	<b>MADUREZ DE LOS OVOCITOS.....</b>	31
2.7.	<b>MANEJO DEL ENSAYO. ....</b>	31
2.7.1.	<b>Recolección de ovarios en matadero.....</b>	31
2.7.2.	<b>Selección del folículo. ....</b>	31
2.7.3.	<b>Obtención de los ovocitos. ....</b>	32
2.7.4.	<b>Selección de los ovocitos. ....</b>	32
2.7.5.	<b>Vitrificación de los ovocitos.....</b>	32
2.7.6.	<b>Desvitrificación de ovocitos.....</b>	33
	<b>CAPÍTULO III.....</b>	34
3.	<b>ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....</b>	34
3.1.	<b>Cantidad de ovocitos obtenidos por cada ovario.....</b>	34
3.2.	<b>Clasificación de los ovocitos según su categoría.....</b>	35
3.3.	<b>Resultados de la vitrificación de los ovocitos de categoría I según su calidad.....</b>	36
3.4.	<b>Resultados de la vitrificación de los ovocitos de categoría I según su madurez.....</b>	37
4.	<b>CONCLUSIONES.....</b>	39
5.	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	40
6.	<b>BIBLIOGRAFÍA CITADA .....</b>	41
6.1.	<b>Libros.....</b>	41
6.2.	<b>CITAS VIRTUALES .....</b>	43
7.	<b>Anexos .....</b>	45

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Grafico 1.</b> Cambios ovaricos y hormonales durante el ciclo estral en la vaca.....	6
<b>Grafico 2.</b> Esquema de la ovogénesis y foliculogénesis.....	13
<b>Grafico 3.</b> Punción folicular.....	15
<b>Grafico 4.</b> Corte folicular para la obtención de ovocitos bovinos.....	16
<b>Grafico 5.</b> Esquema de Clasificación de los COCs.....	18
<b>Grafico 6.</b> Categorías de los ovocitos.....	34

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los ovocitos bovinos.....	17
<b>Tabla 2.</b> Cantidad de ovocitos obtenidos por cada ovario.....	33
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de los ovocitos según su categoría .....	34
<b>Tabla 4.</b> Resultados de la vitrificación de los ovocitos de categoría 1 según su calidad .....	35
<b>Tabla 5.</b> Resultados de la vitrificación de los ovocitos de categoría I según su madurez.....	36

## **RESUMEN**

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción en el Centro de Experimentación y Producción Salache “CEYPSA” de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

El objetivo principal de la presente investigación fue evaluar el efecto de la vitrificación en cuanto a la calidad y madurez de los ovocitos bovinos.

Se recolecto 10 ovarios de vacas faenadas en el camal de Saquisilí, de los cuales se obtuvo un total de 114 ovocitos, obteniendo 50 de categoría I, 37 de categoría II, 27 de categoría III. Para realizar la investigación se tomó solo a los ovocitos de categoría I. Se realizó el lavado de los 50 ovocitos de categoría I, con holding y se procedió a la vitrificación, se almacenó en pajillas previamente estiradas en la plancha térmica y se colocó en un tanque de nitrógeno, posteriormente se procedió a la desvitrificación de todos los ovocitos y se volvió a evaluar en el estereoscopio y se obtuvo como resultado que los 50 ovocitos de categoría I no presentaron ninguna alteración en su calidad y madurez después de la vitrificación.

## **Abstract**

This research was conducted in the laboratory of Reproductive Biotechnology Center of Experimentation and Production Salache "CEYPSA" Technical University of Cotopaxi.

The main objective of this study was to evaluate the effect of vitrification in so far as of the quality and maturity of bovine oocytes.

Collect it 10 ovaries of cows slaughtered in the slaughterhouse Saquisili, of which a total of 114 oocytes was obtained was collected, obtaining 50 of category I, 37 category II, 27 category III. To conduct the research took only oocytes category I. washing the 50 Category I oocytes was performed with holding and proceeded to vitrification in straws was stored previously stretched in thermal plate and placed in a nitrogen tank, then proceeded to the desvitrification of all oocytes and was re-evaluated in the stereoscope and the result was that 50 category I oocytes showed no improvement in their quality and maturity after vitrification.



## ***AVAL DE TRADUCCIÓN***

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro Cultural de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal CERTIFICO que: La traducción del resumen de tesis al Idioma Inglés presentado por el señor Egresado de la Carrera de Agronomía de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales: **LLIGUISUPA LANDIN VICTOR MIGUEL**, cuyo título versa “**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE OVOCITOS BOVINOS CON LA TÉCNICA DE LA VITRIFICACIÓN EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**”, lo realizó bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo al peticionario hacer uso del presente certificado de la manera ética que estimaren conveniente.

Latacunga, Abril del 2015

Atentamente,

Lic. Marcia Chiluisa

**DOCENTE CENTRO CULTURAL DE IDIOMAS**  
C.C. 050221430-7

# INTRODUCCIÓN

La baja fertilidad es uno de los problemas más frecuentes en las explotaciones ganaderas a nivel nacional que impide su desarrollo; ya que al no existir una buena reproducción en el hato bovino no existirá mejoramiento genético por lo tanto una baja producción y habrá menos ingresos económicos para el ganadero. (Autor)

En la actualidad las biotecnologías reproductivas de mayor importancia para las explotaciones ganaderas es la producción de embriones In Vitro, por ello se ha visto la necesidad de buscar nuevas alternativas para la conservación de ovocitos de vacas de gran producción que por diversos problemas de salud, patogenicidad o al llegar a final de su vida productiva se debe realizar el descarte de la misma, como consecuencia se pierde un porcentaje genético muy alto en el hato productivo al no obtener descendientes con el mismo valor genético. (Autor)

La estrategia de vitrificación es básicamente diferente a la estrategia de congelación tradicional. Una velocidad lenta de congelación intenta mantener un delicado balance entre varios factores, los cuales pueden resultar en lesiones celulares provocadas por la formación de cristales de hielo, los choques osmóticos, el efecto tóxico de los crioprotectores, la concentración de electrolitos intracelulares, los daños por enfriamiento, las fracturas en la zona pelúcida y las alteraciones de los organelos intracelulares, el citoesqueleto o el contacto entre las células. (a)

En nuestro país no se encuentra implementada la técnica de vitrificación de ovocitos bovinos como un sistema de banco genético, que permita conservar los ovocitos de ganado vacuno de alta producción o vacas con alta genética. (Autor)

# **OBJETIVOS**

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la calidad de ovocitos bovinos mediante la técnica de vitrificación.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Valorar la calidad y madurez de los ovocitos bovinos antes de la técnica de vitrificación.
- Valorar la calidad y madurez de los ovocitos bovinos después de la técnica de vitrificación

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis Alternativa. Hi**

La vitrificación conservara la calidad y madurez de los ovocitos en bovinos.

### **Hipótesis Nula ho**

La vitrificación no conservara la calidad y madurez de los ovocitos en bovinos.



# **CAPITULO I**

## **1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

### **1.1. ANATOMÍA Y FISILOGIA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA BOVINO**

El tracto reproductivo de la vaca se encuentra debajo del recto, el último segmento del intestino grueso. El aparato reproductor de la vaca comprende los ovarios, oviductos, útero, cérvix, vagina, vulva. (o)

#### **1.1.1. OVARIOS**

Son los órganos esenciales para la reproducción de la hembra, pueden situarse en la cavidad pélvica o en la abdominal dependiendo de la edad, el número de partos, mide aproximadamente de 2 a 4 cm. de largo por 1 a 2 cm. de ancho. (h)

En el ovario activo se distingue dos capas. Una capa cortical (córteX ovárica) donde tendrá lugar el desarrollo de los folículos y de los ovocitos y en la que se encuentran también células secretoras de hormonas. Y una segunda zona o capa medular con tejido conectivo, vascular y nervioso. En el testículo masculino, por el contrario, la producción de espermatozoides y hormonas se llevan a cabo en el interior del mismo. (10)

La capa cortical del ovario en todas las hembras de animales domésticos, excepto en la yegua, está ocupada por los folículos ováricos en distintas fases de

evolución. Esta capa queda envuelta por la túnica albugínea (membrana fibrosa que envuelve al ovario). dicha túnica se va infiltrando en profundidad hasta definir el estroma ovárico que mantiene los folículos en evolución. (10)

### **Funciones:**

Gametogénesis (función exocrina)

- Formación de ovocitos

Síntesis de hormonas (función endócrina):

- Estrógenos (Folículos)
- Progesterona (Cuerpo Lúteo)
- Inhibina
- Oxitocina
- Relaxina. (h)

## **1.2. CICLO ESTRAL**

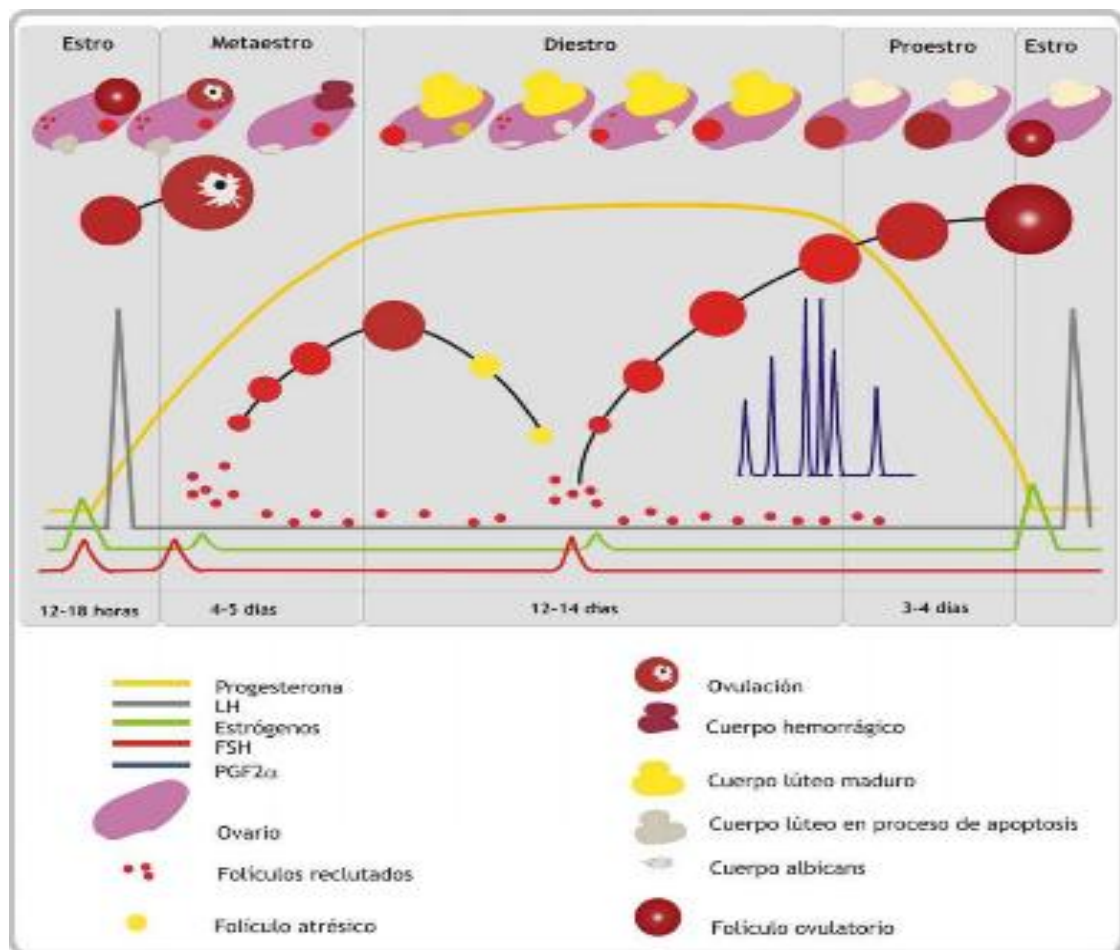
Es el periodo de tiempo que transcurre entre dos celos y dura en promedio 21 días su rango es de 17 a 24 días.

En el transcurso del ciclo estral los ovarios sufren una serie de cambios que finalizan con la ovulación y la expulsión de ovocitos capacitado para ser

fecundado, estos cambios están regulados por diversas hormonas procedentes de distintos órganos (hipotálamo, hipófisis, ovario y útero). (6)

La GnRH es una hormona de origen hipotalámico que estimula en la adenohipófisis la secreción de FSH y la de LH, la FSH es responsable del inicio de la oleada del crecimiento folicular al estimular el reclutamiento mientras que la LH interviene en la maduración final del folículo dominante y en la ovulación.(6)

**GRAFICO 1. CAMBIOS OVARICOS Y HORMONALES DURANTE EL CICLO ESTRAL EN LA VACA.**



**Fuente:** HERNÁNDEZ Cerón (2007)

### **1.2.1. Proestro o período de maduración folicular.**

Este período sigue a la desaparición del cuerpo lúteo, con lo cual disminuye los valores de progesterona. La liberación de hormona folículo estimulante (FSH) por parte del lóbulo anterior de la hipófisis, estimula el crecimiento del folículo y aumenta la síntesis y secreción de estrógenos ováricos, que aumenta el tamaño del útero, vagina y oviductos en una fase preparatoria para la presencia del estro. Este período dura d 2 a 6 días en yegua, 2 a 3 días en rumiantes y en la cerda, y de 4 a 12 días en la perra. (9)

### **1.2.2. Estro.**

Es el período de receptividad de la hembra al macho, caracterizado por las manifestaciones de celo. Es el momento cuando se produce la ovocitación o ruptura del folículo y la formación del cuerpo lúteo o amarillo. La duración del celo y momento que se produce la ovocitación depende de la especie animal. (10)

### **1.2.3. Metaestro o fase luteínica.**

Es la fase que sigue al período de ovulación y se caracteriza por el desarrollo del cuerpo amarillo en el ovario, que inicia la secreción de progesterona. La duración de esta fase depende del tiempo en que la hormona luteotropa (LH) sea secretada por parte de la adenohipófisis. Al aumentarse los niveles de progesterona en la sangre y disminuir los niveles de estrógeno, se evita la proliferación de nuevos folículos ováricos y por lo tanto, no se dan nuevos ciclos estruales, por que el cuerpo lúteo actúa como inactivador de los celos. El futuro del cuerpo lúteo, está condicionado por el del óvulo, ya que si éste es fecundado por un espermatozoide

y se desarrolla el embrión, el cuerpo lúteo mantendrá su actividad, si no hay fecundación, e cuerpo lúteo regresa. (9)

Las funciones que cumple la hormona progesterona secretada por el cuerpo lúteo del ovario son las siguientes:

- Estimula la secreción de las glándulas uterinas.
- Prepara al útero para la implantación y nutrición del óvulo fecundado.
- Reduce la tonicidad de la fibra muscular lisa del útero, así como la sensibilidad de éste a la acción de la hormona oxitocina.
- Impide la maduración de folículos ováricos por acción sobre el hipotálamo y la adenohipófisis.
- Estimula el completo desarrollo y maduración de la glándula mamaria.

Como se puede notar, la progesterona es la hormona responsable del mantenimiento de la gestación, en antagonismo con la hormona estrogénica. (9)

#### **1.2.4. Diestro.**

Representa generalmente la fase más larga del ciclo y corresponde a un período de inactividad sexual. Esta fase va desde la madurez del cuerpo lúteo hasta su desaparición, denominada normalmente regresión. (10)

Las hembras monoéstricas, biéstricas, poliéstricas estacionales, tras el diestro del último ciclo, entran en un anestro estacional, siendo éste el período de tiempo que el ovario permanece en reposo entre dos estaciones reproductivas. En las hembras

poliétricas continuas, tras el diestro vendrá el Proestro comenzando así un nuevo ciclo. (10)

### **1.2.5. Dinámica Folicular.**

El proceso de crecimiento continuo y la regresión de folículos antrales, que culmina con el desarrollo de folículos preovulatorio, se conoce con el nombre de dinámica folicular. Se destacan tres procesos importantes que son, reclutamiento, selección y dominancia. (11)

#### **1.2.5.1. Reclutamiento**

El reclutamiento es un proceso por el que, bajo la responsabilidad de la FSH, un conjunto de folículos antrales tempranos (2-3 mm de diámetro) comienzan a crecer en un medio con suficiente soporte gonadotrófico que les permita progresar a la ovulación. (r)

#### **1.2.5.2. Selección**

Es el proceso por el cual un folículo evita la atresia con la posibilidad de llegar a la ovulación. (7)

#### **1.2.5.3. Dominancia**

La fase de dominancia se sucede cuando el folículo ovárico alcanza un diámetro aproximado de 10 mm, lo cual es señal que ese folículo escapó a la atresia y secreta productos (Inh y E2) capaces de inhibir el reclutamiento de una nueva onda folicular y el crecimiento de los folículos de su cohorte. Cuando el folículo dominante encuentra el ambiente hormonal adecuado (bajos niveles de P4), es

capaz de ovular y como consecuencia se formará el cuerpo lúteo. En caso contrario, cuando el folículo dominante llega a la fase de dominancia durante la fase luteal, en la cual existen altos niveles de P4, cuando los niveles de LH no son suficientes para promover su crecimiento final y ovulación, este folículo dominante pierde su dominancia y permite el reclutamiento y la emergencia de una nueva cohorte de folículos, del cual saldrá el próximo folículo dominante. (s)

### **1.3. OVOGÉNESIS**

La ovogénesis se define como la formación, el desarrollo y la maduración del gameto femenino, este proceso empieza en la vida embrionaria cuando las células germinales primordiales migran a la gónada embrionaria y se convierten en ovogonias y continúa hasta el momento de la ovulación. La ovulación es el proceso por medio del cual el ovocito sale del ovario en un momento apropiado para su fertilización y desarrollo embrionario, este proceso está relacionado con el crecimiento folicular que ocurre bajo el control de las hormonas gonadotrópicas de la glándula hipófisis. El proceso de ovulación también depende del funcionamiento correcto de las glándulas endocrinas que permiten un crecimiento folicular completo; este crecimiento a su vez permite que el ovocito reanude la meiosis y madure, para dar como resultado a los ovocitos secundarios que tienen sólo la mitad de los cromosomas. (a).

La ovogénesis comienza en el embrión femenino con la diferenciación de las células germinales primordiales en ovogonias, que son células madre específica del ovario. Una ovogonia se multiplica por mitosis y comienza la meiosis, pero el proceso se detiene en la profase I. Las células en este estadio, se denominan ovocitos primarios, permanecen en estado de latencia dentro de los folículos pequeños (cavidades cubiertas por células protectoras) hasta la pubertad, la hormona folículo estimulante FSH estimula a un folículo periódicamente para que

crezca e induzca a su ovocito primario a completar la meiosis I y comenzar la meiosis II. (3)

Luego la meiosis se vuelve a detener en estadio de metafase II, ovocito secundario, estadio en el cual ovula y permanece así, hasta que se contacte con el espermatozoide en el momento de la fecundación y se transforme en óvulo. Se debe tener en cuenta que al momento del nacimiento todas las hembras mamíferas nacen con una gran reserva de ovocitos los cuales declinan rápidamente a medida que se llega a la pubertad. No se conoce si este mecanismo representa una eliminación de ovocitos defectuosos que afectarían la eficiencia reproductiva. (7)

#### **1.4. FOLICULOGÉNESIS**

El desarrollo folicular inicia desde la vida fetal, y dos semanas después del nacimiento pueden encontrarse folículos en todas las fases de desarrollo excepto preovulatorios. Los primeros signos morfológicos de crecimiento son la proliferación de células de la granulosa, las cuales cambian de una forma plana a una cubica, así como el crecimiento del ovocito. (j)

El inicio del crecimiento es independiente del estímulo gonadotrófico y está regulado por factores producidos localmente tanto dentro del ovario como dentro del folículo mismo. Entre estos se encuentran; factores de crecimiento, diferenciación y la proteína morfogénica de hueso, producidos únicamente por el ovocito y cuya carencia detiene el crecimiento del folículo en estadio primario. (j)

##### **1.4.1. Folículos primordiales.**

Están formados por el ovocito rodeado de una capa de células foliculares planas (células pregranulosas) y por mecanismos intraovarios, no dependen de las gonadotropinas, comienza a crecer y entran en el pool de folículos en crecimiento.



Los signos más precoces que indican que ha comenzado en crecimiento en este tipo de folículos son: (7)

- Un incremento en el tamaño del ovocito.
- Un cambio en las células granulosa, pasan de planas a cubicas.
- Comienza a formar la zona pelúcida.

#### **1.4.2. Folículos primarios.**

Están formados por ovocitos localizados en el centro poseen una sola capa de células de la granulosa. Se diferencian a partir de células germinales primordiales (oogonios) y permanecen en una profase meiótica suspendida hasta que reanudan su maduración/ ovulación y atresia. (1)

Se presenta los siguientes cambios:

- Crecimiento folicular.
- Proliferación de las células de la granulosa.
- Formación de la zona pelúcida.
- Diferenciación de las células de la teca.

#### **1.4.3. Folículos secundarios.**

Llamados también folículos en crecimiento, son aquellos que rebasan la etapa inactiva como folículos primordiales e inician su desarrollo. Estos folículos secundarios provienen de la división de las células epiteliales periféricas que cercaban al folículo primordial y que posteriormente se rodean de dos o más capas

de células foliculares. Su número es escaso, al comienzo de la hembra pueden encontrarse hasta 200 en el ovario. (9)

#### **1.4.4. Folículos terciarios.**

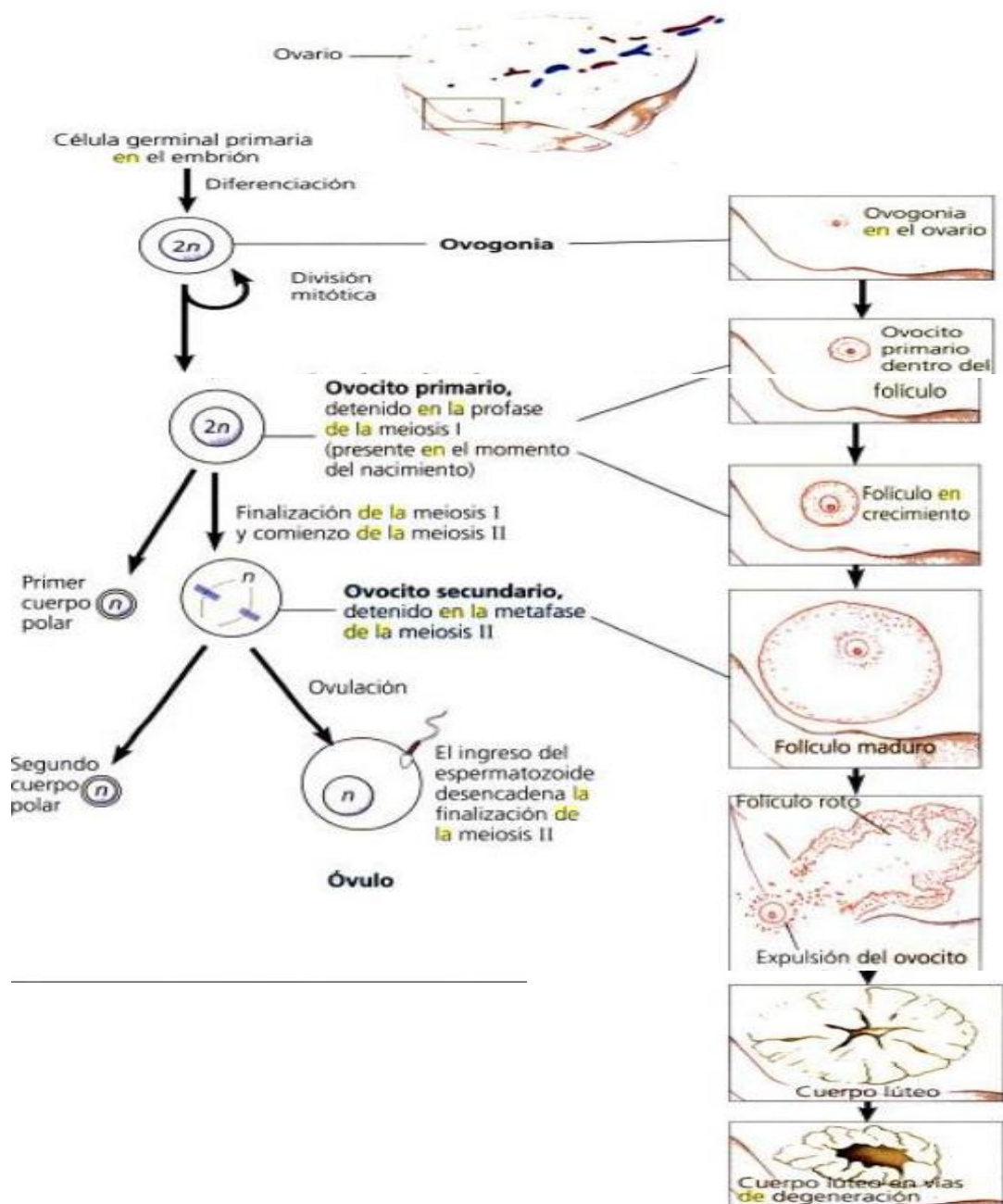
Progresivamente entre las células foliculares aparecen espacios, líquidos confluentes que darán origen al antrum. En este momento el folículo se denomina terciario o antral, y contiene un ovocito con un diámetro entre 100 y 130 micras. El desarrollo del antro permite la segregación de células de la granulosa en células del cúmulo. Éstas se diferencian a la zona radiada, estrato que rodea directamente al ovocito y tienen sutiles prolongaciones. (5)

Las células del cúmulo y de la corona radiada están implicadas principalmente en la comunicación entre el ovocito y el medio que lo rodea: las uniones estrechas entre las células foliculares y la corona radiada por una parte y la corona radiada y el ovocito por la otra garantizan la maduración coordinada del folículo y del ovocito. La acumulación del líquido en el antro es la principal responsable del aumento de tamaño del folículo que se desarrolla hacia el folículo maduro o de Graaf, que en la vaca alcanza un diámetro de 18-20 mm. (4)

Existen dos eventos importantes durante la foliculogénesis, el reclutamiento inicial y el reclutamiento cíclico. El primero se da de una forma continua y empieza en el preciso momento en que se han formado los folículos, mucho antes de la pubertad, y es el responsable de que los folículos primordiales salgan de su estado de reposo y comiencen una etapa de crecimiento. Durante el reclutamiento inicial, factores intraováricos u otros factores desconocidos, estimulan a un grupo de folículos primordiales a iniciar el crecimiento, mientras el resto permanece senescente durante meses o años. Este proceso podría deberse a la liberación de estímulos inhibitorios que hasta ese momento mantenían a los folículos en reposo (1).

El reclutamiento cíclico comienza después de la llegada a la pubertad, como resultado de un aumento en los niveles de FSH circulante durante los ciclos reproductivos. Esto permite que una cohorte de folículos en fase antral sea rescatada del proceso de atresia. En este momento, los folículos han completado su crecimiento y los ovocitos adquirido la zona pelúcida y se encuentran competentes para reanudar la meiosis. De este modo, sólo un número de folículos sobrevivirá, mientras que el resto entrará en atresia (8).

**Grafico 2. ESQUEMA DE LA OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS**



Fuente: CAMPBELL Reece; biología. 2002

## **1.5. RECOLECCIÓN Y TRASNPORTE DE OVARIOS.**

Los ovarios se pueden obtener después de la faena o de la castración de las hembras por medio de un ovariótomo. La obtención después de la faena es la forma más común y económica de obtener los ovocitos con fines experimentales y comerciales. Es la que permitió el desarrollo de la producción In Vitro de embriones bovinos y la que dio comienzo a la producción de embriones a gran escala. (7)

El transporte de los ovarios puede hacerse en solución fisiológica o PBS con antibióticos a temperatura ambiente. Yang y col (1990) fueron los primeros en estudiar el tiempo de conservación de los ovarios a 24-25°C. Los autores observaron que el transporte de los ovarios durante 11h no disminuía la viabilidad de los ovocitos obtenidos. (8)

### **1.5.1. De material de matadero:**

Los ovarios, colectados de hembras faenadas son transportados en termos que contienen suero isotónico a 35-37 °C. La aspiración de los COCs, se realiza aproximadamente dentro de 4 a 6 horas después de faenados los animales. Todos los folículos que no presentan indicios de atresia folicular, entre 2 y 8mm de diámetro, son aspirados. También se puede utilizar una pequeña maquinilla de aspiración. La recuperación es moderada y la "calidad" (capacidad de los ovocitos de completar la meiosis) es "buena", en comparación con la técnica de

desmenuzamiento (con una hoja de afeitar, se corta la superficie del ovario) en la cual la recuperación es alta, pero la calidad de los ovocitos es baja (11).

## **1.6. MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE OVOCITOS.**

### **1.6.1. Recolección de ovocitos por punción.**

El método más simple y comúnmente empleado es el de aspiración de los COCs que consiste en la succión de los folículos situados en la superficie del ovario por medio de una aguja. El diámetro de la aguja utilizada 18-22-g unidas a jeringas estériles de 3-20 ml es considerado importante a efectos de no dañar los ovocitos recogidos. (d).

**Gráfico 3. Punción de folículos.**



**Fuente:** CAMARGO Alexander (2010)

### **1.6.2. Recolección de ovocitos por corte folicular.**

Los ovarios se transportan al laboratorio en solución salina suplementada con antibióticos, a temperatura entre 35-37° C. En el laboratorio, se hace remoción del tejido adyacente, del cuerpo lúteo y de sangre con lavados de solución salina y alcohol. El método de corte consiste en colocar cada uno de los ovarios en cajas de petri que contienen el medio de cultivo y se corta la superficie y el interior de los ovarios a lo largo y a través de éste con cuchillas separadas por 2 mm. (r).

**Gráfico 4. Corte folicular para obtención de ovocitos bovinos**



**Fuente: RAMÍREZ Omar (2013)**

### **1.7. CALIFICACIÓN DE OVOCITOS POR CALIDAD Y MADUREZ**

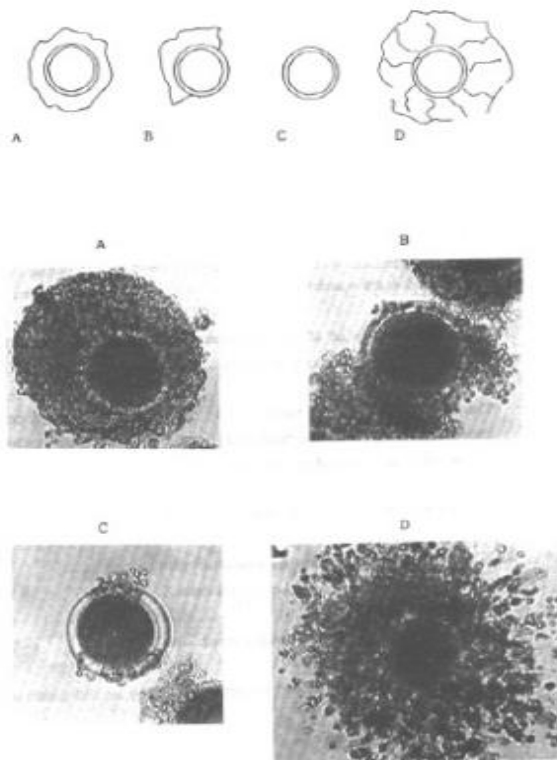
La clasificación de los ovocitos para su cultivo In Vitro se basa en el número de capas del cúmulo que le rodean, se clasifican en cuatro grupos, dividiendo los ovocitos con cúmulo completo en dos tipos, I y II, según la compactación de sus capas (g).

**Tabla 1. CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS BOVINOS**

Clasificación	Criterios
1	Cúmulus con capas múltiples Cúmulos compacto La totalidad el CCO es clara y transparente Citoplasma homogéneo
2	Cúmulus como 1 ó algo más oscuro y menos transparente. Ooplasma con granulación más gruesa y más oscura que en 1 en la periferia
3	Cúmulus menos compacto, más oscuro que en 1 o 2. Con manchas oscuras
4	Cúmulus expandido
Buena	Cúmulus con capas múltiples, compacto pero traslúcido. Ooplasma con granulación fina, densa y uniforme
Regular	Cúmulus ligeramente expandido, con menor número de capas que pueden cubrir la mitad de la zona pelúcida, granulaciones ligeramente más gruesas Cúmulus parcialmente expandido y disperso Red de uniones son presencia de células del cúmulus
Mala	Ovocitos pequeños o grandes, Ovocitos desnudos Cúmulus muy oscuro (marrón oscuro, negro) Ooplasma de color muy claro o negro Ooplasma bueno con áreas muy claras o muy oscuras

**Fuente: PALMA Gustavo (2001)**

**Grafico 5:** Esquema de Clasificación de los COCs.



**Fuente: FILIPIAK Yael y LAROCCA Clara , (2010).**

## **1.8. MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS**

Durante el proceso de maduración tanto in vivo como in vitro de los ovocitos ocurren una serie de cambios, que permiten la reanudación de la meiosis. Estos eventos deben ocurrir antes de la fertilización y se caracterizan por la expansión de las células del cúmulus, la eliminación del primer corpúsculo polar y la formación de la metafase II. Durante el proceso de maduración, la cromatina



contenida en el núcleo del ovocito inmaduro o vesícula germinativa está dispersa, y usualmente se encuentra acompañada de un nucléolo. (d)

El colapso de la vesícula germinal involucra la condensación de la cromatina en pares, con pérdida de nucléolos y membrana nuclear, ocurriendo la diacinesis 16 h después de haber iniciado el cultivo de ovocitos porcinos, de 5 a 6 h en bovinos y de 3 h en conejas, la metafase I en ovocitos de cerdo entre 20 y 24 h y 12 h en bovinos después de haber iniciado el cultivo in vitro, completándose la maduración nuclear cuando se alcanza la metafase II y la expulsión del primer cuerpo polar se lleva a cabo. En general, el 80% de los ovocitos alcanzan la maduración 24 h después de iniciar el cultivo in vitro. (e)

La maduración citoplasmática incluye una sucesión de transformaciones de los orgánulos del ovocito, fundamentalmente de mitocondrias, gránulos corticales y retículo endoplásmico liso y rugoso, todas ellas necesarias, para el progreso de la maduración y el bloqueo de la poliespermia. (11)

También señalan que se producen proteínas de nueva síntesis, como el factor del crecimiento del pronúcleo masculino (MPGF) y el factor promotor de la maduración. Además de estos fenómenos, se produce también la mucificación y expansión del cúmulo que rodea al ovocito y una pérdida del número de las uniones intercelulares, entre las células granulosas y entre éstas y el ovocito, lo que origina una interrupción en el transporte iónico entre cúmulo y ovocito. (g)

## **1.9. TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN.**

Existen dos grandes estrategias de criopreservación procedimientos de congelación lenta o de equilibrio y de congelación ultrarrápida o de no equilibrio:

### **1.9.1. CONGELACIÓN LENTA**

En los procedimientos de congelación lenta, el enfriamiento se realiza a una velocidad suficientemente lenta que permita a las células responder osmóticamente a través de la deshidratación. En otras palabras, debe mantenerse el equilibrio tras el intercambio a través de la membrana, pasando por la máxima deshidratación celular viable. En estos protocolos se reduce la temperatura de manera gradual pasando por un intervalo crítico en el que se aplican velocidades extremadamente lentas ( $-0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) hasta alrededor de  $-50^{\circ}\text{C}$ . a partir de este punto se incrementa un poco la velocidad de enfriamiento, hasta alcanzar los  $-150^{\circ}\text{C}$ , y se sumergen las muestras directamente en NL. Se requiere congeladores programables. (2)

Estos procedimientos presentan el inconveniente de que los ovocitos deben pasar por el intervalo de temperatura en el cual es más probable que ocurra la formación de hielo. Por otra parte, los crioprotectores se utilizan en concentraciones relativamente bajas, con lo que los posibles efectos tóxicos en teoría serían menores. (11)

### **1.9.2. VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS**

La vitrificación se define como la transición de las soluciones acuosas de un estado líquido a un estado vítreo sólido sin la formación de cristales, es decir, que debido al rápido descenso de temperatura, la viscosidad de la muestra aumenta hasta un punto en que las moléculas se inmovilizan. (12).

De esta forma, se encuentran en un estado sólido aunque su estructura molecular sea la de un líquido extremadamente viscoso (estado vítreo). Este aumento extremo de la viscosidad requiere velocidades de enfriamiento muy rápidas (superiores a  $2500\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) o elevadas concentraciones de crioprotectores. (f).

La vitrificación presenta numerosas ventajas como la total eliminación de la formación de hielo o la disminución del daño causado por el enfriamiento, puesto que atraviesa el rango de temperatura de +15 a -5 °C a velocidades de enfriamiento muy rápidas. Otra gran ventaja de esta técnica es que no requiere de equipos de congelación caros o sofisticados y puede ser realizada de manera muy sencilla. (a).

### **1.9.3. MÉTODO DE VITRIFICACIÓN**

La vitrificación consiste en exponer la célula a altas concentraciones del crioprotector por breves períodos, a temperatura ambiente, seguido de un enfriamiento rápido en nitrógeno líquido. La elevada osmolaridad de la solución de vitrificación deshidrata la célula; y la inmersión en nitrógeno solidifica el interior de la célula; de esta manera; se previene la formación de hielo intracelular, y se evita el daño que este puede causar en la criopreservación convencional. (8)

#### **1.9.3.1. Vitrificación de óvulos y pre-embriones**

El uso de embriones congelados a bajas temperaturas (-196 oC en nitrógeno líquido), permite incorporar progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie, transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia, controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales en pie por la de embriones congelados libres de ellas, crear bancos de embriones de valor pecuario, entre otras.(12)

En la actualidad, la crioconservación de embriones de mamíferos ha llegado a ser un procedimiento rutinario en la biología de la reproducción, en los sistemas de

producción animal y en la medicina reproductiva, pudiendo lograrse por procedimientos de congelación estándar y por vitrificación (c).

### **Materiales**

- Agua inyectable.
- Gentamicina.
- Micropipeta de 10 a 100ul.
- Pipetas Pasteur.
- Guantes de latex.
- Medio HTF
- Incubadora.
- Caja de petri de doble camara.
- Estereoscopio
- Reactivos de Vitrificacion WS1, WS2, ES, VS, TS y DS.
- Crio-tops. (a)

### **Metodología**

1. Preparar agua inyectable con gentamicina al 10%
2. Identificar óvulos y colocarlos en caja petri en medio de cultivo HTF con la solución preparada en el paso anterior.
3. Incubar a 37 oC por siete días, diariamente se deben cambiar los medios de cultivo.
4. Poner WS2 por tres minutos. Con una pipeta lavada con agua con gentamicina al 10%, tomar el óvulo o embrión flotando en el WS2 y los reactivos VS, WS2, ES, TS, DS y WSI, deben de colocarse por separado cada uno en cajas de petri pequeñas para someter los óvulos y embriones en cada uno de estos reactivos.
5. Colocar los óvulos o embriones en el reactivo ES de 5 a 10 minutos.

6. Enseguida al reactivo VS por un minuto.
7. Posteriormente en TS por un minuto.
8. Y por último en DS por tres minutos.
9. Después se procede a colocar el óvulo o el embrión con ayuda de una micropipeta en el capilar del crio-top.
10. Almacenar a -80 oC. (12)

### **1.10. DESVITRIFICACIÓN DE OVOCITOS**

Las temperaturas extremadamente bajas (-196 °C en nitrógeno líquido) a las que se someten los óvulos y los embriones detienen casi por completo la actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc. (7)

De esta manera es posible almacenar embriones durante un largo periodo en buen estado a la hora de desvitrificar sin causarle daño alguno a los óvulos o embriones.  
(c)

#### **1.10.1. Desvitrificación de óvulos y pre-embryones**

Los registros de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones revelan que más del 50% de 500 000 embriones de bovino transferidos en los últimos años han sido usados después de ser congelados y descongelados (a).

Las temperaturas extremadamente bajas (-196 oC en nitrógeno líquido) a las que se someten los óvulos y los embriones detienen casi por completo la actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc. De esta manera es posible almacenar embriones durante un

largo periodo en buen estado a la hora de desvitrificar sin causarle daño alguno a los óvulos o embriones (c).

### **Materiales**

- Agua inyectable.
- Gentamicina.
- Micropipeta de 10 a 100ul.
- Pipetas Pasteur.
- Guantes de látex.
- Medio HTF
- Incubadora.
- Caja de petri de doble cámara.
- Estereoscopio
- Reactivos de desvitrificación TS, DS, WS1 y WS2.
- Crio-tops. (a)

### **Metodología**

1. Someter el crio-top a 37 °C.
2. Sumergir el capilar del crio-top donde se encuentra el óvulo o embrión congelado en el reactivo TS por un minuto.
3. Con una Micropipeta lavada con el agua con gentamicina al 10%, tomar el óvulo o embrión sumergido en el reactivo TS y colocarlo dentro de otra caja petri con el reactivo DS por 3 minutos.
4. Luego en someterlo al reactivo WS1 por 5 minutos.
5. Finalmente en WS2 por 5 minutos.

6. Después de este tratamiento los óvulos o embriones están listos para su fertilización o para realizar transferencia de embriones. (a)

## **CAPÍTULO II**

### **2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

En este capítulo se detalla la metodología y materiales que se utilizó para realizar la presente investigación, también se describe las características y ubicación del lugar donde se realizó la investigación.

#### **2.1. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR.**

##### **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° 31'9.16"W.
- **Altitud:** 2757.591 m.s.n.m.

### **2.1.3. DATOS METEOROLÓGICOS.**

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

Fuente: Registros administración CEYPSA 2012

## **2.2. MATERIALES.**

### **2.2.1. MATERIALES DE OFICINA**

- Papel Bond.
- CDS.
- Libreta.
- Copias.
- Anillados.
- Empastados.
- Impresiones.

### **2.2.2. RECURSOS TECNOLÓGICOS**



- Cámara fotográfica.
- Flash Memory.
- Internet.

### **2.2.3. MATERIALES DE LABOBARORIO**

- Guantes.
- Mandil.
- Estereoscopio.
- Sustancia de holding.
- Tubos de ensayo.
- Medios de vitrificación.
- Medios de desvitrificación.
- Agua inyectable.
- Centrifuga.
- Micropipeta.
- Cajas de petri.
- Nitrógeno líquido.
- Jeringuillas.
- Tijera.

### **2.2.4. MATERIALES DE CAMPO**

- Overol.
- Termo.
- Botas.
- Guantes.
- Gorra.

### **2.2.5. MATERIAL BIOLÓGICO.**

- Ovarios de vacas del matadero.

## **2.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

### **2.3.1. INVESTIGACIÓN NO EXPERIMENTAL.**

En la investigación no experimental las variables independientes ya han ocurrido, en este caso los ovocitos bovinos y no pueden ser manipuladas, el investigador no tiene control directo sobre dichas variables, no puede influir sobre ellas porque ya sucedieron, al igual que sus efectos.

### **2.3.2. INVESTIGACIÓN DESCRIPTIVA.**

El objetivo de la investigación descriptiva consiste en llegar a conocer las situaciones, costumbres y actitudes predominantes a través de la descripción exacta de las actividades, objetos, procesos y personas. Su meta no se limita a la recolección de datos, sino a la predicción e identificación de las relaciones que existen entre dos o más variables. Los investigadores recogen los datos sobre la base de una hipótesis o teoría, exponen y resumen la información de manera cuidadosa y luego analizan minuciosamente los resultados, a fin de extraer generalizaciones significativas que contribuyan al conocimiento.

## **2.4. MÉTODOS**

### **2.4.1. 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. Con este

método pudimos comparar entre los resultados y las hipótesis planteadas en la investigación.

#### **2.4.2. Método Científico.**

El método científico es un proceso destinado a explicar fenómenos, establecer relaciones entre los hechos y enunciar leyes que expliquen los fenómenos físicos del mundo y permitan obtener, con estos conocimientos, aplicaciones útiles al hombre. Los científicos emplean el método científico como una forma planificada de trabajar. Empleamos este método para exponer el proceso utilizado para obtener los mejores resultados en nuestra investigación.

#### **2.5. UNIDAD DE ESTUDIO**

La presente investigación se realizó con 50 Ovocitos calificados.

#### **2.6. VARIABLES EVALUADAS**

##### **2.6.1. CALIDAD DE LOS 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.

## **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 del cúmulo.

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

**Categoría 3.** Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y desprovisto de células del cúmulo.

**Categoría 4.** Ovocitos con citoplasma polarizado y rodeado en su totalidad por células del cúmulo. (q)

## **2.7. MANEJO DEL ENSAYO.**

### **2.7.1. Recolección de ovarios en matadero.**

La recolección de ovarios se realizó de vacas sacrificadas en matadero del cantón Saquisilí provincia de Cotopaxi.

Se obtuvieron inmediatamente después de la muerte del animal, verificando que no presente ninguna anomalía del mismo.

Se ubicó en suero fisiológico a todos los ovarios recolectados para transportarlos al laboratorio de la reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

### **2.7.2. Selección del folículo.**

Se seleccionó los folículos claros y de menor tamaño ya que los ovocitos provenientes de estos folículos son de mejor calidad.

### **2.7.3. Obtención de los ovocitos.**

En la presente investigación se realizó, por el método de punción folicular ya que es el método más utilizado en la obtención de ovocitos de vacas de descarte.

Se colocó el líquido folicular en un tubo de ensayo para posteriormente centrifugar y con una pipeta absorber el sedimento donde se encuentran los ovocitos y pasar a una caja petri todo el sedimento obtenido con la pipeta.

Se observó en el estereoscopio, y se preparó otra caja petri con sustancia holling para colocar los ovocitos obtenidos para realizar el lavado de los mismos, para posterior realizar la selección de los ovocitos según su calidad, y continuar con el proceso de vitrificación.

### **2.7.4. Selección de los ovocitos.**

La selección se efectuó siguiendo dos criterios:

1. Aspecto citoplasmático del ovocito, debe poseer un citoplasma granulado fino y uniforme, sin mostrar espacio perivitelino ni vacuolizaciones.
2. Aspecto y morfología del cúmulo celular que le rodea, del que afirman que no debe encontrarse expandido ni disperso sino compacto y sin aglutinaciones.

### **2.7.5. Vitrificación de los ovocitos.**

Antes de realizar la vitrificación se debe alargar las pajilla en las que se va almacenar los ovocitos vitrificados, para lo cual se utilizó una plancha, y luego se efectuó un corte sagital a las mismas por la mitad

Teniendo listo las pajillas alargadas, se realizó la vitrificación ubicando los ovocitos en los medios de vitrificación pasando de la menor dilución a la mayor dilución en relación a las concentraciones de los crioprotectores comerciales.

Se colocó en una caja petri dos gotas, una gota de cada solución en las cuales se ubicará los ovocitos calificados de la siguiente manera:

1. 3 minutos en la solución 0,5 mmol. (Roja)
2. 1 minuto en la solución 1.4 mmol. (Amarilla)

Luego se procedió a cargar a los ovocitos previamente calificados y vitrificados en las pajillas para posterior ubicarlas en un termo con nitrógeno líquido.

#### **2.7.6. Desvitrificación de ovocitos.**

Se realizó pasando los ovocitos de la dilución mayor de crioprotectores a la menor en relación a las concentraciones de los crioprotectores comerciales.

Se procedió de la siguiente manera:

1. 0,5 minutos en la solución 2.4 mmol.
2. 1 minuto en la solución 1.4 mmol.

Una vez desvitrificados se valoró si los ovocitos conservan la misma calidad y madurez que tenían antes de realizar la vitrificación.

## **CAPÍTULO III**

### **3. ANALISIS DE LOS RESULTADOS.**

En este capítulo se detallan los resultados obtenidos al culminar el experimento.

#### **3.1. Cantidad de ovocitos obtenidos por cada ovario.**

**TABLA N° 2 Cantidad de ovocitos obtenidos por cada ovario**

<b>OVARIOS</b>	<b>OVOCITOS</b>
1	16
2	12
3	14
4	11
5	8
6	10
7	12

8	9
9	13
10	9
<b>TOTAL</b>	114

**FUENTE:** Directa.

**ELABORADO:** LLIGUISUPA Víctor.

Los 10 ovarios se recolectaron en el camal de Saquisilí, de los cuales se obtuvieron un total de 114 ovocitos, posteriormente se procedió a clasificarlos según su calidad y madurez seleccionando o los ovocitos que presenten calidad y madurez de categoría I para proceder con la técnica de la vitrificación.

### **3.2. Clasificación de los ovocitos según su categoría.**

**TABLA N° 3. Clasificación de los ovocitos según su categoría**

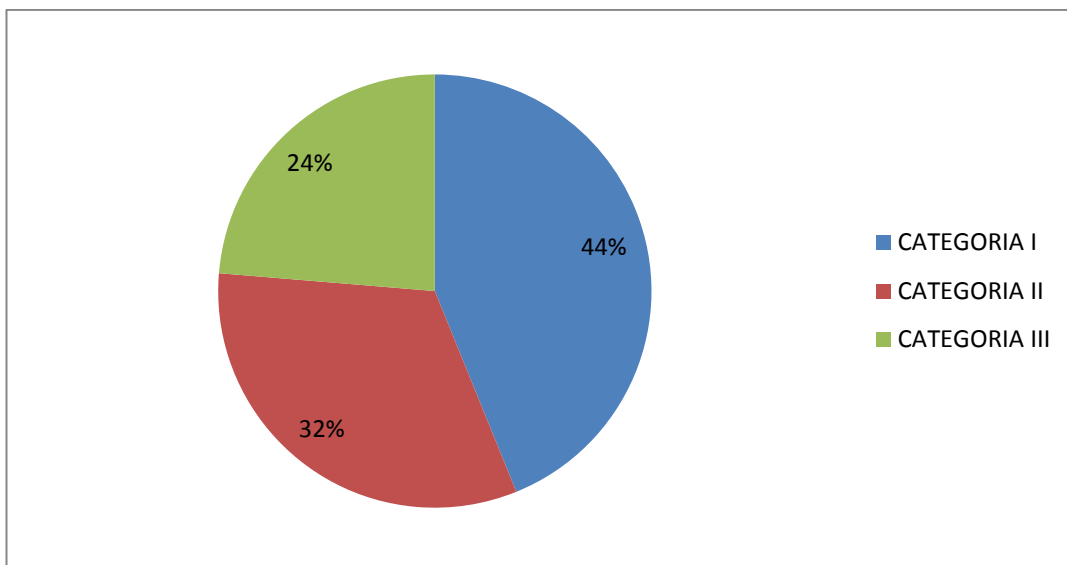
<b>Categorías</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje %</b>
<b>I</b>	50	44%
<b>II</b>	37	32%
<b>II</b>	27	24%
<b>TOTAL</b>	<b>114</b>	<b>100%</b>

**FUENTE:** Directa.

**ELABORADO:** LLIGUISUPA Víctor.

### **GRAFICO N° 6 Categorías de los ovocitos.**





**FUENTE:** Directa.

**ELABORADO:** LLIGUISUPA Víctor.

Como se observa en la tabla número 3 y grafico número 6, se obtuvieron 114 ovocitos los cuales 50 son de categoría I (Buenos) representando el 44%, estos presentan cúmulus compacto y el citoplasma homogéneo. Estos ovocitos de categoría I son aptos para realizar la técnica de la vitrificación.

También se observa que existen 37 ovocitos de categoría II (Regulares) representando el 32% y 27 de ovocitos de categoría III (Malos) representando el 24% los cuales fueron descartados.

Los resultados de esta investigación se diferencia de los datos obtenidos de la investigación por Gardón Juan Carlos que recolecto 3180 ovarios obteniendo 18524 ovocitos de los cuales 5305 fueron clasificados como aptos y 13219 como no aptos, obteniendo un porcentaje de 28,63% de ovocitos aptos y un 71,36% de ovocitos no aptos.

### **3.3. Resultados de la vitrificación de los ovocitos de categoría I según su calidad.**

**TABLA N° 4 Resultados de la vitrificación de los ovocitos de categoría I según su calidad.**

<b>OVARIOS</b>	<b>OVOCITOS</b>	<b>CALIDAD ANTES DE LA VITRIFICACIÓN</b>	<b>CALIDAD DESPUES DE LA VITRIFICACIÓN</b>
1	8	1	1
2	5	1	1
3	7	1	1
4	6	1	1
5	4	1	1
6	5	1	1
7	3	1	1
8	4	1	1
9	5	1	1
10	3	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>		

**FUENTE:** Directa.

**ELABORADO:** LLIGUISUPA Víctor.

Como se observa en la tabla número 4, los 50 ovocitos de categoría I después de haber sido vitrificados y posteriormente desvitrificados no presentaron ninguna alteración ya que presentan un cúmulus con capas múltiples y compacto, su citoplasma homogéneo, todos conservaron la misma calidad perteneciendo a la categoría I.

Los resultados obtenidos en esta investigación presenta una pequeña diferencia la obtenida por Landinez, J; Baez, F; Pirela, A; Villamediana, P. ya que obtuvieron una tasa de 91, 42 y 88,63% en los tratamientos de vitrificación (OPS y MG).

### **3.4. Resultados de la vitrificación de los ovocitos de categoría I según su madurez.**

**TABLA N° 5 Resultados de la vitrificación de los ovocitos de categoría I según su madurez.**

<b>OVARIOS</b>	<b>OVOCITOS</b>	<b>MADUREZ ANTES DE LA VITRIFICACIÓN</b>	<b>MADUREZ DESPUES DE LA VITRIFICACIÓN</b>
1	8	1	1
2	5	1	1
3	7	1	1
4	6	1	1
5	4	1	1
6	5	1	1
7	3	1	1
8	4	1	1
9	5	1	1
10	3	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>		

**FUENTE:** Directa.

**ELABORADO:** LLIGUISUPA Víctor.

Como se observa en la tabla numeró 5, los 50 ovocitos de categoría I después de haber sido vitrificados y posteriormente desvitrificados no presentaron ninguna alteración ya que conservan el mismo citoplasma granulado homogéneo y rodeado en su totalidad por una masa compacta de células del cúmulo teniendo la misma madurez perteneciendo a la categoría I.

#### **4. CONCLUSIONES.**

Los resultados obtenidos en la presenta investigación en Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi, permiten llegar a las siguientes conclusiones.

Los criterios tomados en cuenta para la selección de los ovarios, folículos y ovocitos son de suma importancia para lograr excelentes resultados en la vitrificación de ovocitos.

Al realizar la técnica de la vitrificación se logró conservar el 100% de los ovocitos sometidos a esta técnica, por lo que nos sirve de gran ayuda para la

conservación de células sexuales femeninas de alto valor genético que podemos utilizarlas para mejoramiento de nuestras ganaderías.

Los ovocitos no presentaron ninguna alteración en cuanto a su calidad y madurez después de haber sido expuestas a los medios de vitrificación y posteriormente desvitrificados por lo tanto la técnica de la vitrificación es una alternativa que nos permite conservar ovocitos de vacas de muy buena genética que deben ser descartadas de un hato por su edad o por presentar alguna patología.

## **5. RECOMENDACIONES.**

Se debe continuar realizando investigaciones, en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi, en reproducción animal ya que con la reproducción podemos seguir avanzando en cuanto a mejoramiento genético y calidad de producción de las distintas especies animales destinadas a la producción en nuestro país.

Tomar como una alternativa la vitrificación para la conservación de ovocitos para crear un banco genético con células sexuales femeninas para fecundación in vitro y proporcionar a los pequeños y grandes productores animales de alto valor genético en menor tiempo.

Fomentar la técnica de la vitrificación para que exista conocimiento en nuestro país de que si se puede realizar la vitrificación para obtener avances en reproducción que es uno de los principales problemas en una explotación ganadera.

Por otra parte para realizar la vitrificación se debe estar capacitado de cómo realizar la desvitrificación para poder realizar fecundación in vitro incluso utilizar estos ovocitos para transferencia de embriones.

## **6. BIBLIOGRAFÍA CITADA**

### **6.1. Libros.**

1. B. Hafez y E.S.E. Hafez; 2010; Reproducción e Inseminación Artificial en animales; ISBN- 0-683-30577-8
2. Callejo Olmos Justo; Preservación de la fertilidad en la paciente oncológica; Editorial Glosa, S.L; ISBN 978-84-7429-410-1.

3. Campbell Reece; Biología; Editorial Médica Panamericana; ISBN 978-84-7903-998-1.
4. Durán Ramírez Felipe Manual ganadero actual (Tomo 3) Grupo latino Editores Ltda. ISBN 978-958-8203-40-9
5. Elli Massimiliano; 2005; Manual de reproducción en ganado vacuno; Edición Servet, Diseño y comunicación S.L. ISBN 978-84-934736-0-0
6. Luis A. Quintanella, Carlos Díaz de Pablo, Pedro García, Ana Peña, Juan Becerra; Ecografía y Reproducción en la vaca; Editor Servicio de Publicación e Intercambio Científico; ISBN 84-9750-775-4, ISBN 978-84-9750-775-2.
7. Palma Gustavo; 2001; Biotecnología de la Reproducción; Editor Instituto Nacional de tecnología Agropecuaria; ISBN 987-43-3779-6.
8. Urbina Lener Biber; 2008; Fertilidad y reproducción asistida; Editorial médica panamericana; ISBN 978-980-6908-16-1.
9. Urroz Carlos; Elementos de anatomía y Fisiología animal; Editor EUNED 1991; ISBN 9977646023, 9789977646022.
10. P. Caravaca Rodríguez; J. M. Castel Genís; J. L. Guzmán Guerrero; M. Delgado Pertiñez; Y. Mena Guerrero; M. J. Alcalde Aldea y P. Gonzales Redondo; Bases de la Producción animal; 2003; ISBN 84-472-0764-1.
11. Carlos Leyva Orasma; Alberto Barreras Serrano; Modesto Varizanga Diamong; Transferencia no Quirúrgica de Embriones en el Ganado Bovino; 1999; ISBN 970-9051-00-8

12. Bonilla Musoles; Reproducción Asistida Abordaje en la parte clínica; 2009; ISBN 978-84-9835-156-9.

## 6.2. CITAS VIRTUALES

- a) Albarracin José; 2005; (17 de febrero del 2013)  
<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5729/jlam1de1.pdf?sequence=1>  
.
- b) Castellano Luz; 2011; (15 de febrero del 2013);  
<http://www.slideshare.net/LUZCASTELLANO/mtodos-deductivo-y-inductivo-7318991>
- c) Celestinos y Gatica, 2002; (18 de febrero del 2013)  
<http://www.uacj.mx/ICB/cqb/licenciaturaenbiolog%C3%ADa/Documents/Manuales/optativas/BIOLOGIA%20DE%20LA%20REPRODUCCION.pdf>
- d) Gardón Juan Carlos; 1999; (16 de febrero del 2013);  
<http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/407/13079219.pdf?sequence=2>.
- e) Gallegos Mayela Patricia; 1998; (17 de febrero del 2013)  
<http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080110336.PDF>.
- f) Islas Efraín y Gutiérrez José de Jesús; 1995; (15 de febrero del 2013);  
<http://www.uaa.mx/centros/cca/MVZ/M/7/Manualdepracticass32-1531.pdf>.



- g) Lorenzo Pedro; 1992;(17 de febrero del 2013)  
<http://eprints.ucm.es/tesis/19911996/D/2/AD2007601.pdf>.
- h) López Carlos; 2010; (15 de febrero del 2013);  
<http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/AFA/TEORICOS/14%20-%20Aparato%20reproductor%20hembra.pdf>
- i) Macedo José Luis; 2006; (15 de febrero del 2013)  
<http://www.infolactea.com/descargas/biblioteca/356.pdf>
- j) Medina Alberto; 2011 (16 de febrero del 2013);  
<http://www.vetzoo.umich.mx/phocadownload/Tesis/2011/Febrero/efecto%20del%20numero%20de%20lactancia%20y%20produccion%20sobre%20la%20tasa%20de%20gestacion%20a%20primer%20servicio%20implementando%20el%20protocolo%20doble%20ovsynch.pdf>.
- k) Nebel Ray; 2006; (15 de febrero del 2013)  
[http://www.selectsires.com/dairy/SpainResources/reproductive\\_anatomy\\_spanish.pdf](http://www.selectsires.com/dairy/SpainResources/reproductive_anatomy_spanish.pdf).
- l) Pfister Frank Joseph 2007 (15 de febrero del 2013)  
<http://www.vetzoo.umich.mx/phocadownload/Tesis/2007/Abril/principios%20basicos%20en%20el%20uso%20de%20la%20inseminacion%20artificial%20en%20ganado%20bovino%20lechero.pdf>.
- m) Rippe Christian; 2009; (20 de febrero del 2013);  
<http://www.reproduccionanimal.net/v02/wp-content/uploads/2012/01/Libro6704-COMUNICACIONES-cortas.pdf>
- n) Trujillo Gentil 2008 (15 de febrero del 2013) <http://cegbucc.foro.es.biz/t23-anatomia-y-fisiologia-del-tracto-reproductivo-parte-2>.

- o) Villasuso J. (18 de febrero del 2013)  
[http://newton.cnice.mec.es/materiales\\_didacticos/mcientifico/index.htm](http://newton.cnice.mec.es/materiales_didacticos/mcientifico/index.htm).
- p) Wattiaux Michel; 2012; (16 de febrero del 2013)  
<http://www.venezuelaganadera.com/enciclopedia-ganadera/la-funcion-reproductiva-del-ganado-lechero>.
- q) <http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/viewArticle/9265/11058>
- r) Ramírez Omar; 2013; (23 de julio del 2013)  
<http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/genetica/articulos/dinamica-folicular-bovina-t4841/103-p0.htm>
- s) Tahís del Valle Días; 2008; (23 de julio del 2013)  
[http://www.avpa.ula.ve/libro\\_desarrollosost/pdf/capitulo\\_44.pdf](http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_44.pdf)

## **7. Anexos**

Recolección de ovarios en el camal de Saquisilí



Extracción de ovocitos



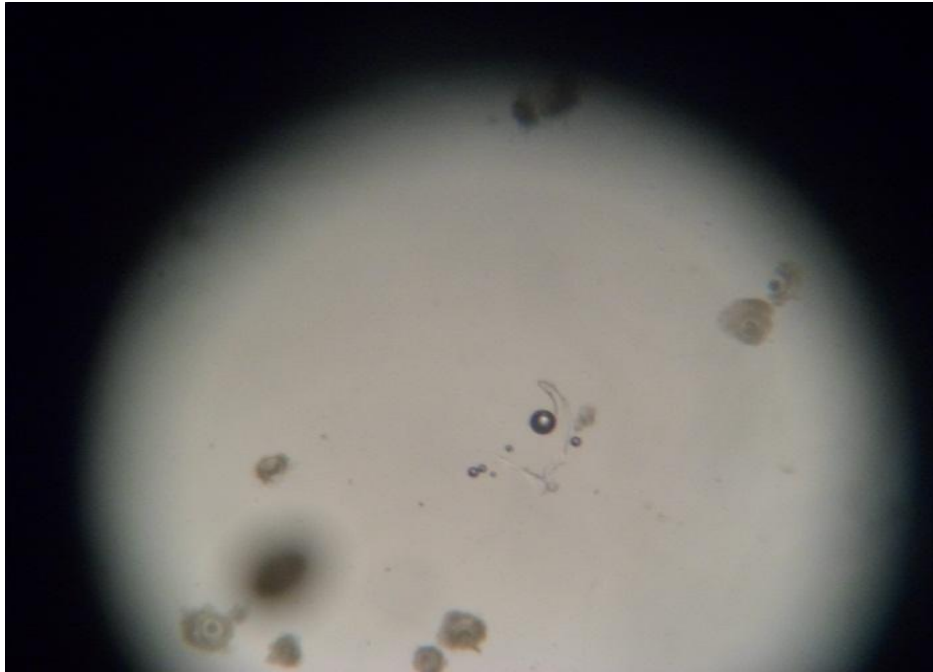
Tubo de centrifuga con líquido folicular, listo para centrifugarlo



Líquido folicular para la selección de ovocitos en el estereoscopio.



Clasificación de ovocitos



Vitrificación de ovocitos



Colocación de la pajilla en nitrógeno líquido



Desvitrificación de ovocitos.



Evaluación de la calidad después de la desvitrificación de ovocitos.

