

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
RECURSOS NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

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

TEMA:

“EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACIÓN DE OVOCITOS EN CUYES  
(CAVIA PORCELLUS) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE  
LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE  
LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”

AUTORA:

DIANA MARIBEL NARANJO ZAPATA

DIRECTORA:

Dra. PAOLA LASCANO

## **AUTORÍA**

Yo, Diana Maribel Naranjo Zapata , 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 prestado 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 la propiedad intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

## CERTIFICADO

### DE LA DIRECTORA DE TESIS

En mi calidad de Directora de la Tesis titulada **“Evaluación de la Crioconservación de ovocitos en cuyes (Cavia Porcellus) en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi”**, propuesta por la egresada Diana Maribel Naranjo Zapata 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 al acto de defensa de tesis.

.....

Dra. Paola Lascano

DIRECTORA DE TESIS

## CERTIFICADO

### DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL

En calidad de miembros del tribunal de pregrado aprueban el presente informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi y UA-CAREN por cuanto la postulante con el tema de tesis **“Evaluación de la Crioconservación de ovocitos en cuyes (*Cavia porcellus*) en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi ”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y añade los méritos suficientes para ser sometido al acto de defensa de tesis.

Fue revisado por:

Dr. Msc. Enrique Estupiñán

.....

PRESIDENTE DE TRIBUNAL

Dr. Cristian Arcos

.....

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Dra. Marcela Andrade

.....

OPOSITOR DE TRIBUNAL

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico principalmente a mis padres Ángel Efraín Naranjo Panchi y Elsa Fabiola Zapata Reinoso por su amor, comprensión, educación, entrega, enseñanzas, consejos, fuerza y apoyo incondicional que me brindaron para cumplir con una meta más en mi vida, que solo con el amor de padres he podido conseguir lo que hasta ahora he alcanzado.

A mi hermana Paola a quien también le dedico este triunfo por su apoyo y confianza.

Sin duda alguna este triunfo se la dedico a toda mi familia que estaba conmigo en los momentos más difíciles de mi vida ya que supieron comprenderme y apoyarme en todo momento.

**Diana Maribel Naranjo Zapata**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, nuestro Señor, por el maravilloso don de la vida, por todos los buenos y malos momentos de la vida estudiantil, los cuales han constituido uno de los elementos claves para mi formación personal, intelectual y espiritual.

A mis padres y hermana, por su cariño, comprensión y apoyo incondicional que me brindaron para seguir adelante y ayudarme a llegar hasta donde soy ahora.

A la Dra. Paola Lascano, docente de la carrera de Medicina Veterinaria y directora de mi tesis, expreso de manera especial mi agradecimiento por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección.

Mi sincero agradecimiento a la Universidad Técnica de Cotopaxi, a la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, y a todos los docentes que fueron partícipes en mi formación profesional, quienes demostraron ser unas personas que siempre esperan lo mejor para sus alumnos, no sólo brindando sus conocimientos, sino también sus consejos y amistad.

Finalmente, agradezco a todas las personas que directa o indirectamente me brindaron su apoyo para la realización de este trabajo.

## **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”

.....  
DIANA MARIBEL NARANJO ZAPATA

## PRELIMINARES

Portada	i
Autoría	ii
Aval de la directora	iii
Aval de los miembros de tribunal	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Declaración expresa	vii
Índice de contenido	ix
Índice de figuras	xii
Índice de cuadros	xiii
Índice de gráficos	xiv
Índice de anexos	xv
Índice de fotos	xvi
Resumen	xvii
Abstract	xviii
Aval de traducción	xix
Introducción	xx
Objetivo General	xx
Objetivos Específicos	xxi
Hipótesis	xxi



## ÍNDICE DE CONTENIDO

### CAPÍTULO I

1.	Revisión de literatura	1
1.1.	Anatomía del aparato reproductor de la hembra	1
1.1.1.	Ovarios	2
1.1.2.	Comparación de las anatomías del ovario	3
1.2.	Ovogénesis	3
1.2.1.	Crecimiento del folículo y ovocito	5
1.2.2.	Maduración de los ovocitos	7
1.2.3.	Maduración nuclear	8
1.2.4.	Maduración citoplasmática	9
1.3.	foliculogénesis	10
1.3.1.	Folículos primordiales	12
1.3.2.	Folículos primarios	12
1.3.3.	Folículos secundarios	12
1.3.4.	Folículos terciarios	13
1.3.5.	Folículos de Graff	13
1.4.	Características morfológicas del ovocito	13
1.4.1.	Corpúsculo polar	13
1.4.2.	Espacio perivitelino	14
1.4.3.	Zona pelúcida	14
1.4.4.	Citoplasma	14
1.5.	Crioconservación de ovocitos	14
1.6.	Métodos para la obtención de los ovocitos	15
1.6.1.	Corte de ovarios	15
1.6.2.	Aspiración de líquido folicular	15
1.7.	Clasificación de los ovocitos.	16
1.7.1.	Los ovocitos clasificados en cuatro etapas	16
1.8.	Evaluación de la calidad de los ovocitos	16

1.9.	Crioprotectores	17
1.9.1.	Etilenglicol	18
1.9.2.	Holding	18
1.10.	Congelación	19
1.11.	Descongelación	19

## **CAPÍTULO II**

2.	Materiales y Métodos	21
2.1.	Características del lugar	21
2.1.1.	Situación política	21
2.1.2.	Situación geográfica	21
2.1.3.	Datos meteorológicos	21
2.2.	Materiales	22
2.2.1.	Materiales de oficina	22
2.2.2.	Recursos tecnológicos	22
2.2.3.	Materiales de laboratorio	23
2.2.4.	Materiales de campo	24
2.2.5.	Animales	24
2.3.	Diseño de la investigación	24
2.3.1.	Tipo de investigación	24
2.3.2.	Metodología	24
2.3.3.	Métodos y técnicas	24
2.3.4.	Análisis estadístico	24
2.4.	Desarrollo de la investigación	25

## **CAPÍTULO III**

3.	Resultados y Discusiones	27
3.1.	Numero de ovocitos recolectados	27

3.2.	Estado de madurez	29
3.3.	Ovocitos criopreservados y pos descongelados	30
CONCLUSIONES		31
RECOMENDACIONES		32
BIBLIOGRAFÍA		33
ANEXOS		

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Anatomía del Aparato Reproductor de la Hembra	1
FIGURA 2	Organización Histológica del Ovario	3
FIGURA 3	Crecimiento, Capacitación y Maduración de ovocitos	8
FIGURA 4	Estructuras Ováricas	13
FIGURA 5	Clasificación de los ovocitos de acuerdo al Tipo A,B,C	16
FIGURA 6	Pasos para la descongelación	20

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1	Comparación de las anatomías del ovario	3
CUADRO 2	Aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de folículos ováricos.	11
CUADRO 3	Ovocitos colectados y caracterizados en tres tipos	27
CUADRO 4	Estado de madurez	29
CUADRO 5	Calidad de ovocitos crioconservados y pos descongelados	30

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Calidad de ovocitos	28
GRÁFICO 2	Estado de madurez de ovocitos	29
GRÁFICO3	Calidad de ovocitos crioconservados y pos descongelados	30

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1	Ovocitos por método de slicing con centrifugación
ANEXO 2	Número de ovocitos colectados
ANEXO 3	Ovocitos por método de slicing sin centrifugación
ANEXO 4	Calidad de ovocitos post descongelado

## ÍNDICE DE FOTOS

FOTO 1	Extracción de ovarios
FOTO 2	Ovarios en cloruro de sodio al 0.9%
FOTO 3	Método de slicing
FOTO 4	Lavados con holding
FOTO 5	Colocación en la caja Petri
FOTO 6	Vista al Estereomicroscopio
FOTO 7	Evaluación de la calidad de ovocitos
FOTO 8	Colocación de pajilla en Crioconservadora
FOTO 9	Seeding
FOTO 10	Evaluación post descongelado
FOTO 11	Visita de tribunal



## RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi. Se utilizó 20 cuyes hembras de segundo parto, las cuáles fueron sacrificadas para la obtención de 40 ovarios, mismos que fueron recolectados en recipientes estériles con cloruro de sodio al 0.9% permitiendo el mantenimiento fresco de los ovarios y evitando que produzca daños a nivel de las estructuras ováricas. El objetivo principal de esta investigación fue la evaluación de la crioconservación de ovocitos, utilizando técnica de slicing (corte de ovarios), en el cual consiste en realizar cortes finos y separados en la superficie e interior del ovario con la finalidad de extraer el líquido folicular, colocarlo en una caja Petri y mediante microscopia observar las características morfológicas de los ovocitos, mediante este trabajo se determinó los parámetros de calidad antes y después de la congelación y el estado de madurez de los ovocitos. El análisis estadístico de esta investigación está basado en porcentajes (100%) y se obtuvo los siguientes resultados de 40 ovarios se obtuvo 66 ovocitos los mismos que están categorizados en: Tipo A con un 62,12%, Tipo B con un 10,60% y Tipo C con 27,27% y de acuerdo al estado de madurez se determina que el 62,12% corresponden a inmaduros y el 37,87% corresponden a maduros, mientras que los ovocitos crioconservados y post descongelados representan un 62.12% concluyendo que no provocaron cambios irreversibles antes y después de la congelación.

## ABSTRACT

The present research was carried out in the Laboratory of Biotechnology of the Reproduction of the Cotopaxi Technical University carrer in Veterinary Medicine. There were used of second birth 20 guinea pigs females , which were sacrificed to obtain 40 ovaries , which were collected in sterile containers with sodium chloride 0.9% allowing fresh maintenance of ovaries and avoiding causing damage at the level of ovarian structures. The main objective of this research was to evaluate the cryopreservation of oocytes using slicing technique (cut of ovaries), which consists in dorny fine-cut and separated on the surface and inside of the ovary to extract fluid follicular, after put it in a petri dish, through of the observation by microscopy, could observed the morphological characteristics of oocytes, with this work determined the quality parameters and after freezing and the maturity of the oocytes. The statics analysis of this research is based on percentages (100%) and the following results were obtained from 40 ovarian oocytes obtained 66 there of which are categorized in to Type A with a 66 ,12% , Type B with a 10,60% and Type C with 27,27% and according to the state of maturity is determined that 62,12% are immature and 37,87% are mature, while oocytes thawed cryopreserved and post represent 62,12% , concluding that did not come irreversible changes before and after freezing.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**

**CENTRO CULTURAL DE IDIOMAS**

***AVAL DE TRADUCCIÓN***

En calidad de Docente del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi, yo Lic. Chiluisa Chiluisa Marcia Janeth, con cédula de ciudadanía N° 050221430-7 CERTIFICO que he realizado la respectiva revisión de la traducción del abstract con el tema: “EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACIÓN DE OVOCITOS EN CUYES (CAVIA PORCELLUS) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI” cuya autora es: Diana Maribel Naranjo Zapata y director de tesis Dra. Paola Lascano.

Latacunga, Febrero 2014

Docente:

.....

Chiluisa Chiluisa Marcia Janeth

C.I. 050221430-7

## **INTRODUCCIÓN**

En lo que se refiere a cobayos el Ecuador cuenta con una población de 15 millones de cuyes debido al avance tecnológico en lo que es el mejoramiento genético, especialmente en proyectos gubernamentales para comunidades campesinas ya que constituye para estas su fuente de alimentación y adicionalmente sustento económico para su familia lo que ha llevado a buscar alternativas para mejorar la productividad de los mismos siendo una de estas la crioconservación de material genético (ovocitos).

La degeneración genética y la no existencia de la técnica en el Ecuador han determinado acudir a técnicas de biotecnología en donde se pudo guardar material genético conservando los recursos zoogenéticos mediante bancos de ovocitos.

Esta investigación se realizó para determinar la factibilidad de crioconservación de los ovocitos siendo una alternativa para la producción de esta especie.

Además en la actualidad se está buscando realizar bancos de germoplasma de todos los mamíferos ya que esto permitirá determinar la genética y los cambios que la misma va teniendo por diversas transformaciones como manejo, medio, alimentación, etc.

Por lo tanto en esta investigación se plantea los siguientes objetivos e hipótesis.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la crioconservación de ovocitos en cuyes (*Cavia porcellus*) en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar los parámetros de calidad de los ovocitos extraídos en función de las características morfológicas mediante microscopía.
- Determinar problemas de descenso de temperatura que afecta la calidad de los ovocitos post descongelado en función a sus características morfológicas mediante microscopía.
- Determinar el protocolo de crioconservación de ovocitos de cuyes hembras de matadero.

## **HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

Se crioconservará ovocitos de cobayos

## **HIPÓTESIS NULA**

No se crioconservará ovocitos de cobayos

# CAPÍTULO I

## 1. REVISIÓN DE LITERATURA

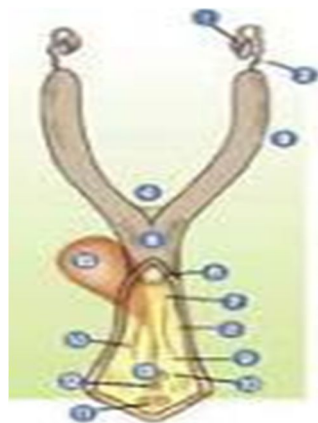
En el presente capítulo se trata las principales características anatomía y fisiología del aparato reproductor de la hembra y finalmente el tema relacionado al estudio de los ovocitos extraídos de los ovarios considerando su morfología, maduración y su clasificación de acuerdo a las fases que presente cada uno de los ovocitos.

### 1.1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra:

Los órganos de este sistema casi todos se encuentran alojados en el abdomen, producen los óvulos y ayudan a que estos puedan ser fertilizados, se desarrollen durante la gestación o involucionen para dar pasó a otro ciclo sexual de la hembra.

Los órganos del aparato reproductor de la hembra incluyen ovarios, oviductos, útero, cuello uterino, vagina y vulva. (1)

FIGURA 1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA



FUENTE: Hafez 2000

### 1.1.1. Ovarios

Son órganos pares que se encuentran situados detrás de los riñones de cada lado, son pequeños de 7 mm de largo y 4 mm de ancho, pesa 0,033g, son los encargados de formar los óvulos.

Funciones: Liberación de óvulos (función exócrina)

Esteroidogénesis (función endócrina)

El tejido predominante del ovario es la corteza en donde las células germinales primordiales se originan fuera de las gónadas y migran a través del mesenterio del saco vitelino hacia las crestas genitales.

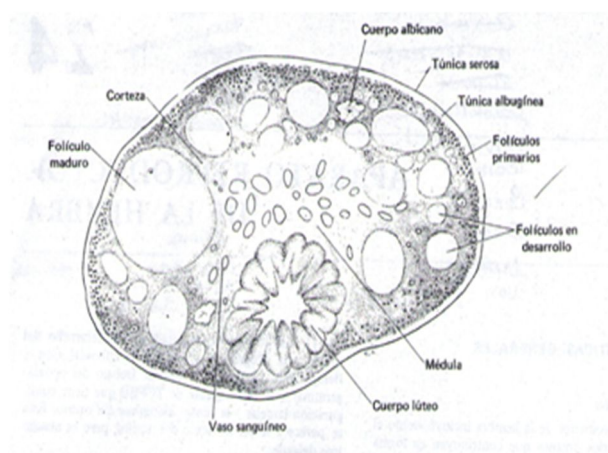
Durante el desarrollo fetal, las oogonias se producen por multiplicación meiótica; posteriormente viene la primera división meiótica hasta que se forman varios millones de ovocitos, proceso que se detiene en la profase.- La atresia posterior reduce el número de oocitos al momento del nacimiento y en la pubertad ocurre una reducción adicional de modo que durante la senectud reproductiva solo quedan unos pocos. (8)

Al nacimiento, una capa de células foliculares rodea a los ovocitos primarios en el ovario y de ella se forman los folículos primordiales, la forma y el tamaño de los ovarios varía de acuerdo a su especie y el ciclo estral. En bovinos y ovinos tiene en forma de almendra mientras que en la yegua tiene la forma arriñonada debido a la presencia de una fosa de ovulación bien definida y una indentificación en el borde de unión del ovario, en la cerda semeja a un racimo de uvas debido a que los folículos sobresalen y los cuerpos amarillos oscurecen el tejido ovárico subyacente.

El ovario está constituido por la médula y corteza, está rodeado por el epitelio superficial llamado epitelio germinal, mientras que la médula ovárica consiste del tejido conjuntivo fibroelástico dispuesto en forma irregular y de extensos sistemas vascular y nervioso que llegan al ovario a través del hilio (unión entre el ovario y mesovario).

La corteza ovárica contiene los folículos ováricos, cuerpos lúteos en diferentes etapas de formación o regresión, el tejido conjuntivo de la corteza contiene muchos fibroblastos, fibras colágenas y reticulares, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras musculares lisas. (4)

FIGURA 2. ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL OVARIO



FUENTE: Adams y Evans 2003

### 1.1.2. Comparación de las Anatomías del ovario en diferentes especies

CUADRO 1. Comparación de las Anatomías del ovario en diferentes especies

	VACA	OVEJA	CERDA	YEGUA	CONEJA	CUY
NÚMERO	2	2	2	2	2	2
FORMA	Almendra	Almendra	Racimo de uvas	Arriñonada	Ovoide	Ovoide
TAMAÑO	3.5-4 largo 2.5 ancho	1.5x1x1	5 largo y ancho.	7- 8 largo 3-4ancho	1.5cm	7 x4mm

FUENTE: E.S.E. Hafez. Reproducción e Inseminación artificial. Séptima Edición

## 1.2. Ovogénesis

Durante el desarrollo fetal, las células germinales primordiales del ovario van a sufrir un proceso de diferenciación. Primero se transforman en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a los ovocitos primarios al iniciarse la primera división meiótica.

La meiosis es un tipo de división celular exclusiva de las células germinales (ovogonias y espermatogonias) y su objetivo es doble: la reducción a un número



haploide de cromosomas y la recombinación de la información genética, antes de sufrir la meiosis, las células germinales replican su ADN y contienen en ese momento 4 copias de ADN y un número  $2n$  de cromosomas, como cualquier célula diploide; mientras que entre las dos divisiones meióticas la replicación de ADN queda suprimida, lo que asegura que los gametos resultantes sean haploides.(10)

La meiosis consiste en dos divisiones: en la primera, las dos células hijas pasan a tener  $1n$  cromosomas y 2 copias de ADN; y en la segunda, las 2 células resultantes contienen  $1n$  cromosomas y 1 copia de ADN. Así, con la meiosis se obtienen 4 células hijas haploides y genéticamente diferentes, en el caso del macho; mientras que en la hembra sólo da lugar a una célula, pues las dos divisiones meióticas son asimétricas, y en cada una se forman una célula grande y otra pequeña abortiva (corpúsculo polar). De este modo, se minimiza la pérdida de productos almacenados en el ovocito, necesarios para el posterior desarrollo embrionario temprano. (15)

En las hembras, toda la población de ovocitos entra en meiosis sincrónicamente en la vida fetal.- La primera división meiótica progresa hasta que el ovocito alcanza el estadio de diplotene difuso de la profase I (estado dictiatio), donde se produce la primera detención de la meiosis, justo antes o poco después del nacimiento, a partir de este momento, el ovocito comienza a ser rodeado por células pregranulosas, las cuales forman una membrana basal alrededor de ellas, quedando formado el compartimento folicular. La primera parada de la meiosis se mantiene hasta momentos antes de la ovulación o de la atresia folicular y es importante para asegurar que el ovocito disponga de tiempo suficiente para crecer antes de la fecundación, de modo que sea capaz de mantener el proceso de la embriogénesis.(25)

Esta interrupción se mantiene mediante un sistema de control múltiple en el que están implicados el adenosínmonofosfato cíclico (AMPC) , la hipoxantina y el

factor inhibidor de la maduración del ovocito cuya finalidad es mantener inactivo al factor promotor de la maduración (MPF). (b)

### **1.2.1. Crecimiento del folículo y ovocito**

El ovocito y el folículo sufren un periodo de crecimiento, que se caracteriza por ser una fase de intensa síntesis proteica y de almacenamiento de macromoléculas.

El folículo primordial se transforma en folículo primario, donde el ovocito está rodeado por una capa unilaminar de células granulosas cuboides, derivadas de las pregranulosas, en el folículo primario se produce un aumento del volumen del ovocito, sin división celular del mismo, y una hiperplasia e hipertrofia de las células de la granulosa, dando lugar al folículo secundario (un folículo preantral multilaminar). (11)

El crecimiento folicular va acompañado de la formación de una capa de células de la teca vascularizada alrededor de la membrana basal, al alcanzar las células de la granulosa un número elevado, y en respuesta a la FSH, se forma la cavidad antral repleta de fluido folicular, tras la formación del antro, las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones: las células de la granulosa que revisten la pared del folículo y forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal; y las células del cumulus oophorus que forman varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito. Cuando el folículo ha formado la cavidad antral, pasa a llamarse folículo terciario, antral o de Graff.(10)

El crecimiento del ovocito va unido a un aumento en el número de orgánulos citoplasmáticos, como mitocondrias, aparato de Golgi y ribosomas, y a la formación de los gránulos corticales a partir del complejo de Golgi. Toda esta maquinaria celular, indicativa de una elevada actividad metabólica, permite la síntesis y almacenamiento de ARN, proteínas y enzimas y, en las últimas etapas del crecimiento, el desarrollo de la red de microtúbulos y filamentos, también durante la fase de crecimiento se forma la zona pelúcida (ZP) una cubierta

extracelular glicoproteica que rodea a los ovocitos mamíferos. La capa de células del cúmulus más próxima a la ZP se conoce con el nombre de corona radiata. (3)

En esta etapa de crecimiento se van a establecer unas comunicaciones entre el ovocito y las células del cúmulus, mediante unos procesos citoplasmáticos de las células de la corona radiata que cruzan la ZP y conectan con el oolema, estas uniones intercelulares posibilita el intercambio de moléculas entre el ovocito, las células de la granulosa y la circulación sanguínea, con una finalidad nutritiva y reguladora, constituyendo el proceso de “cooperación metabólica”. Las células somáticas proporcionan nucleótidos, aminoácidos y fosfolípidos, además de mantener un balance iónico y una estabilidad en el ARNm en los ovocitos. (D)

Los folículos dominantes serán seleccionados de entre los folículos antrales para continuar su crecimiento y mediante la selección de los folículos que producirán ovocitos maduros listos para ovular en cada ciclo estral está determinada por la expresión de receptores para la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) en sus células de la granulosa.(19). Por ejemplo, en los folículos antrales pequeños, cuyas células de la granulosa no poseen receptores para la LH, la reanudación de la meiosis inducida por esta gonadotropina no se podrá producir; por lo tanto, los folículos seleccionados deberán disponer de estos receptores.

Los receptores para la FSH, presentes en la hembra en las células de la granulosa, aumentan de número en la fase de crecimiento, la misma que va actuar sobre las células de la granulosa, desencadenando la expresión de una batería de genes que codifican factores de crecimiento, enzimas y proteínas involucradas en la esteroidogénesis y péptidos que regulan la liberación de gonadotropinas; los cuales se van a sintetizar y acumular en el fluido folicular, además las células de la teca, estimuladas por la LH, van a sintetizar andrógenos que, posteriormente serán transformados en estradiol por las células de la granulosa.(6)

Los folículos dominantes tienen un mayor número de receptores para la FSH y son más sensibles a ella que el resto de folículos antrales, por lo que van producir

grandes cantidades de estradiol e inhibina. El estradiol y la inhibina van a regular negativamente la secreción de FSH y, al disminuir su concentración, los folículos menos sensibles a la FSH degeneran, sufriendo el proceso de atresia.(12)

Justo después del pico preovulatorio de LH, los folículos seleccionados comienzan una rápida expansión como resultado de la acumulación de fluido folicular en el antro. Las altas concentraciones de gonadotropinas en el fluido folicular cambian el patrón de síntesis de esteroides de las células de la granulosa y la teca y preparan al ovocito para la reanudación de la meiosis y la maduración.(8)

### **1.2.2. Maduración de los ovocitos**

La maduración del ovocito está dividida en maduración nuclear y maduración citoplasmática, hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membranas que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente.(a)

El estímulo que desencadena el inicio de la maduración del ovocito es el aumento preovulatorio de los niveles de gonadotropinas, en especial LH además de la reanudación de la meiosis, el pico de LH desencadena otras transformaciones dentro del folículo como alteraciones en la esteroidogénesis folicular y cambios en el complejo cúmulos-ovocito (COCs), la respuesta inmediata de las células de la granulosa a la interacción con la LH es la activación de la adenilatociclasa y la generación de AMPc. (21)

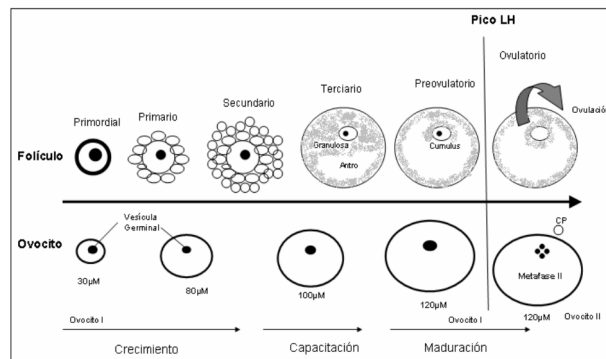
Por tanto, la reanudación de la meiosis viene precedida por un aumento en el AMPc; mismo que desempeña un papel doble en la regulación de la meiosis, por ende los niveles basales de AMPc producidos por las células somáticas en los folículos antrales pequeños son transferidos de manera continua al ovocito, a través de las uniones tipo gap, sin embargo, a partir de la formación de receptores para la LH en las células del cúmulus y granulosa del grupo de folículos

dominantes, éstos pueden responder al pico preovulatorio de la LH produciendo grandes cantidades de AMPc. (7)

Las elevadas concentraciones de AMPc en los folículos dominantes intervienen en la acción de la LH sobre la conexina 43, una proteína que forma parte de las uniones tipo gap ováricas. Mediante reacciones de fosforilación/defosforilación, se producen cambios en la conformación de la conexina 43 que inducen una inmediata reducción de las comunicaciones intercelulares en dichos folículos y, por tanto, en la cooperación metabólica entre sus células.

Este fenómeno, conocido como expansión o mucificación del cúmulus se produce 16 horas después del pico de gonadotropinas; bajo esas condiciones, el flujo de AMPc desde las células del cúmulus hacia el ovocito desciende por debajo del umbral requerido para inhibir la activación del factor promotor de la maduración o de la metafase (MPF) y el ovocito reanuda la meiosis.(18)

FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL CRECIMIENTO DEL OVOCITO, CAPACITACIÓN Y MADURACIÓN DURANTE LA FOLICULOGÉNESIS



FUENTE: Mermillod et al., 1999.

### 1.2.3. Maduración Nuclear

Comienza tras la reanudación de la meiosis es decir el paso de vesícula germinal a metafase II (MII) con lleva la disolución de la membrana nuclear como “rotura de la vesícula germinal”, la formación del huso meiótico y la condensación de

cromatina en cromosomas homólogos que se alinean en el huso, alcanzan el estadio de metafase I, para continuar con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos dando lugar a la extracción del primer corpúsculo polar (CP) y al paso del ovocito al estadio de MII.

La maduración nuclear finaliza cuando el ovocito completa la primera división meiótica con la formación del primer corpúsculo polar alcanzando el estadio de MII, después del pico de LH, tras lo cual se produce la segunda detención de la meiosis.(16)

El MPF en forma activa es necesario para la rotura de la VG , la condensación de la cromatina y su actividad alcanza un pico en Metafase I y II, para decrecer en anafase I y II lo que indica que su inactividad también es necesaria para esta progresión , por otra parte la reorganización de los microtúbulos y la apropiada orientación del huso durante la MII parece estar mediada por las MAP kinasas (MAPK), cuya actividad también esta inhibida de algún modo por el AMPc y aumenta con la reanudación de la meiosis. A diferencia del MPF, la actividad del MAPK permanece elevada en los estadios de anafase.(e)

#### **1.2.4. Maduración Citoplasmática**

Abarca una serie de acontecimientos no directamente relacionados con la progresión de la meiosis pero que preparan al ovocito para la fecundación y el desarrollo embrionario.

En el citoplasma del ovocito se produce una redistribución de las mitocondrias y de los gránulos corticales (GC) . Tras la rotura de la VG, las mitocondrias migran para situarse en una posición perinuclear durante la maduración siendo este movimiento mitocondrial necesario para la progresión de la maduración. (2)

Los GC son un tipo especial de lisosomas primarios, formados a partir del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico, compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas. Los GC migran hacia la periferia del ovocito, aumentan de

número al final del periodo de maduración y se sitúan debajo de la membrana plasmática formando una monocapa.

Además, la maduración citoplasmática implica una reprogramación de la síntesis proteica, parte del ARNm que había sido almacenado durante la fase de crecimiento comienza a transcribirse, sintetizándose nuevas proteínas que serán esenciales en la progresión de la meiosis, la regulación de la penetración espermática y la descondensación de la cabeza del espermatozoide.(14)

### **1.3. Foliculogénesis**

Es el proceso de crecimiento que experimenta el folículo desde el momento que deja la población de reserva constituida por folículos primordiales, hasta su ovulación o atresia.

El folículo ovárico es una unidad altamente compleja y consiste de distintos tipos de células somáticas este folículo provee un microambiente para el crecimiento del ovocito y es el responsable para la producción de Hormonas. (19)

Los ovocitos rodeados por las células de la granulosa y su membrana basal y, posteriormente por células intersticiales para formar la teca mismos que comparten un sistema de comunicación muy eficiente. Así mismo, el ovocito tiene un papel activo en la promoción del desarrollo folicular y en la diferenciación de las células de la granulosa a través de la secreción de factores de crecimiento por otra parte, las células de la granulosa regulan el crecimiento del ovocito.

El ovocito interactúa con las células de la granulosa que lo rodean, lo que evita la luteinización precoz del cumulus ooforus por inhibición del receptor de LH, y regula también la esteroidogénesis y la secreción de inhibina. (3)

El inicio del crecimiento es independiente del estímulo gonadotrófico y está regulado por factores producidos localmente dentro del ovario como dentro del folículo mismo. Entre estos se encuentran; factores de crecimiento, diferenciación

producida únicamente por el ovocito y cuya carencia detiene el crecimiento del folículo en estadio primario.

CUADRO 2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LOS FOLÍCULOS OVÁRICOS

COMPONENTES	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS
Células de la teca	Producen andrógenos en respuesta al incremento de niveles de LH. Después de la ovulación se transforman en células luteínicas de la teca.
Pared folicular	Formada por granulosa y teca separadas por lamina basal
Células de la granulosa	En folículos preovulatorios hay conexión entre proyecciones de células de la granulosa a través de la lámina basal Ovulación: La capa granulosa es invadida por vasos y material conectivo
Corona radiada	Antes de la ovulación: El óvulo se encuentra en el extremo del folículo ovárico inmerso en una capa de células foliculares.
Folículo primordial	Folículos con ovocitos colocados en el centro en una sola capa de células de la granulosa.
Folículo secundario	Aumenta el número de células de la granulosa por mitosis
Folículo vesicular	Folículos en los que acumula el líquido folicular en el antro dentro de las células epiteliales.
Líquido folicular en el antro	Inhibidor de la maduración de los ovocitos, inhibidor de la unión de LH, inhibina y enzimas
Líquido folicular entre las células	Viscoso y rico en ácido hialurónico

FUENTE: E.S.E. Hafez. B. Hafez. Reproducción e Inseminación artificial. Séptima

Edición



### **1.3.1.Folículos primordiales**

Están formados por el ovocito rodeado de una capa de células foliculares planas (células pregranulosas) y por mecanismos intraováricos no dependiente de gonadotrofinas, comienzan a crecer y entran en el pool de folículos en crecimiento. Los signos más precoces que indican que ha comenzado el crecimiento en este tipo de folículos son:

- 1.- Un incremento en el tamaño del ovocito
- 2.- Un cambio en la forma de las células granulosas, pasan de planas a cúbicas
- 3.- Comienza a formar la zona pelucida. (12)

### **1.3.2.Folículos primarios**

Posteriormente las células cúbicas se multiplican y aparecen 2 o más capas de las mismas.- En este momento una red de capilares invade la trama fibrosa ubicando entre las células que rodean al folículo y constituyen la capa vascular teca interna, la cual aporta los nutrientes a la membrana granulosa y al ovocito, por fuera de esta capa se encuentra la teca externa rica en tejido conectivo y fibroblastos. (23) .

### **1.3.3. Folículos secundarios**

Comienza aparecer espacios entre las células granulosas, consecuencia de la secreción de un material de consistencia líquida por parte de dichas células estos espacios posteriormente confluyen en una cavidad denominada antro folicular, el cual irá aumentando en tamaño hasta adquirir características de aquel presente en el folículo preovulatorio o de Graff. (9)

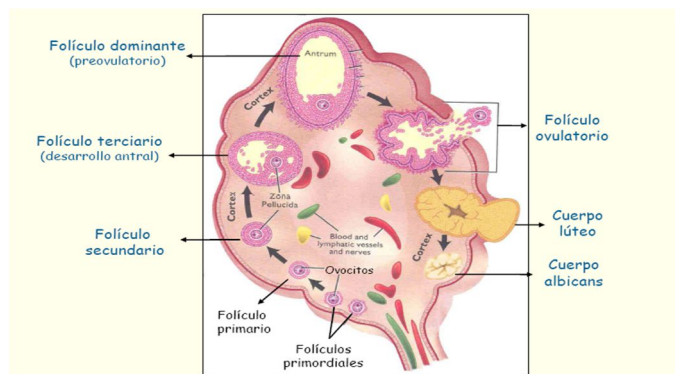
### 1.3.4. Folículos terciarios

El líquido presente en esta cavidad se le denomina licor folicular, a partir de la aparición de la cavidad folicular, los folículos reciben el nombre de folículos terciarios. (19).

### 1.3.5. Folículos de Graff

Son folículos terciarios ya madurados que resaltan sobre la superficie ovárica como una pequeña vesícula llena de líquido folicular están formados por dos capas de células foliculares o tecas (interna y externa) separadas por una membrana basal de la cubierta celular interior de granulosa que rodea el antro folicular y el ovocito. (19)

FIGURA 4. ESTRUCTURAS OVÁRICAS



FUENTE: Senger, 2004

## 1.4. Características morfológicas del ovocito

### 1.4.1. Corpúsculo polar

La presencia de un corpúsculo polar biomorfo, aunque no afecte a la tasa de fecundación, si afecta al posterior desarrollo del embrión, así como a la tasa de preñez.

### **1.4.2. Espacio perivitelino**

Un espacio perivitelino agrandado, irregular, con contenido en su interior, disminuye la tasa de embarazo, aunque no afecte a la tasa de fecundación.

### **1.4.3. Zona pelúcida**

La existencia de una zona pelúcida engrosada, adelgazada, irregular o tabicada o con diferente densidad, afecta a la tasa de ovocitos que no continúan su desarrollo tras la ICSI (Inyección intracitoplasmática del espermatozoide).

### **1.4.4. Citoplasma**

La presencia de anomalías del citoplasma como granulaciones, inclusiones, cuerpos refráctales, vacuolas, etc., se ha demostrado que disminuye la tasa de embarazo). Otros autores consideran que las anomalías en el citoplasma son un factor pronóstico pobre, aunque si un signo de inmadurez citoplasmática también se ha demostrado una relación directa entre las anomalías citoplasmáticas y el número de anaploidias. ( c)

## **1.5. Crioconservación de Ovocitos**

La crioconservación de ovocitos es un proceso fisicoquímico complejo de transporte de agua y calor entre la célula y el medio que lo rodea, la crioconservación se lleva a cabo mediante las exposiciones de ambos a temperaturas bajas.

Si sobrepasa de la temperatura se producirá la formación de los cristales de hielo lo que provocara alteraciones en la membrana, cuándo la suspensión celular es enfriada y alcanza a temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo

distribuidos aleatoriamente en el medio extracelular que dan lugar a una fase cristalina.(13)

## **1.6. Métodos empleados para la obtención de los ovocitos**

La mayor importancia de los métodos de recolección de los ovocitos es maximizar el número total de los ovocitos y que estos sean de buena calidad (citoplasma homogéneo y varias capas compactas de células del cúmulo) recuperados por ovarios que puedan ser utilizados para la maduración, fecundación y cultivo in vitro. (13)

Para la recolección de los ovocitos se realiza mediante la extracción de los ovarios de animales muertos, esta técnica suministra una abundante obtención de ovocitos provenientes de los animales de diferentes etapas reproductivas. La recolección de los ovocitos provenientes de animales muertos se realiza mediante los siguientes métodos.

### **1.6.1. Corte de ovarios**

Los ovarios deben ser recolectados directamente y transportados en solución salina suplementada con antibióticos a temperaturas óptimas.- El método de corte consiste en colocar los ovarios en cajas Petri que contengan medios de recolección de los ovocitos y cortar la superficie y el interior de los ovarios con la ayuda de bisturís realizando cortes finos y separados la misma que tiene como finalidad de obtener ovocitos inmaduros de ovarios procedentes de matadero.

### **1.6.2. Aspiración de líquido folicular**

Los folículos ováricos superficiales deben ser absorbidos con agujas hipodérmicas estériles, una vez extraído el contenido debe ser colocado en cajas Petri para luego ser observadas en el microscopio y determinar la calidad de los ovocitos. (9)

## 1.7. Clasificación de los ovocitos

Se determina de acuerdo al número y compactación de las células del cúmulo y al grado de homogeneidad del citoplasma.

### 1.7.1. Los ovocitos pueden ser clasificados en cuatro etapas:

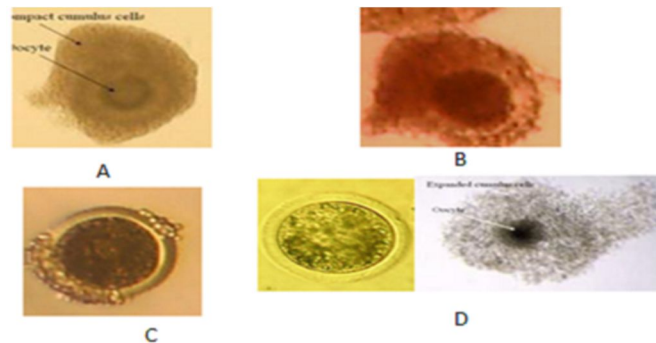
Tipo A: Corresponde a un ovocito con células de cumulus con capas múltiples mayor a 4, son compactas y el citoplasma es homogéneo y transparente.

Tipo B: Capas múltiples de cumulus de 1 a 3, con citoplasma homogéneo y zonas periféricas oscuras.

Tipo C: Cumulus denudado y con citoplasma irregular con zonas oscuras.

Tipo D: Tiene un cumulus con células expandidas y un citoplasma irregular con zonas oscuras. (11)

FIGURA 5. CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS DE ACUERDO AL TIPO (A,B,C,D)



FUENTE: Hernández, a. 2006.

## 1.8. Evaluación de la calidad de los ovocitos

Se debe tomar en cuenta los siguientes parámetros:

### **1. *Inmaduro***

- Pequeño, compacto, gris, cumulus no expandido
- Células de corona formando un anillo oscuro alrededor de la zona pelúcida, ovocito apenas visible.

### **2. *Maduro***

- Cumulus expandido, pequeño.
- Corona no irradiada completamente.
- Ovocito parcialmente visible.

### **3. *Maduro y excelente***

- Cumulus grande y expandido
- Corona irradiada
- Ovocito claro y visible.

### **4. *Sobre maduro***

- Cumulus pequeño y fino con pequeños parches de células oscuras.
- Se podrá observar un ovocito visible usualmente oscuro.

### **5. *Post maduro y atrésico***

- Pequeños cumulus o totalmente
- Ovocito oscuro (e)

## **1.9. Crioprotectores**

Son sustancias que protegen a las células durante la crioconservación con la finalidad de evitar el daño que puede causar el agua intracelular al formar cristales de hielo durante la congelación, reducen el hielo y reemplazan las moléculas de

agua removidas durante la congelación, inhiben la actividad de muchas enzimas disminuyendo la lisis celular antes, durante y después de la congelación.(14)

### **1.9.1. Etilenglicol**

El etilenglicol es un compuesto químico que pertenece al grupo de los dioles, es un líquido transparente, incoloro, ligeramente espeso como el almíbar y leve sabor dulce por estas características organolépticas se suele utilizar distintos colorantes para reconocerlo y así disminuir las intoxicaciones por accidente, a temperatura ambiente es poco volátil, pero puede existir en el aire en forma de vapor.

Se utiliza como anticongelante en los circuitos de refrigeración de motores de combustión interna, como difusor del calor, para fabricar compuestos de poliéster, y como disolvente en la industria de la pintura y el plástico.

El etilenglicol es también un ingrediente en líquidos para revelar fotografías, fluidos para frenos hidráulicos y en tinturas usadas en almohadillas para estampar, bolígrafos, y talleres de imprenta.(b)

### **1.9.2. Holding**

Holding Plus es el primer medio de mantenimiento de transferencia de embriones bovinos basado en una fórmula adaptada de un medio de cultivo de embriones probado.

Está diseñado para apoyar la supervivencia óptima de embriones en aire a temperatura ambiente y proporciona los aminoácidos, factores de crecimiento, enzimas, sustratos de energía y antibióticos esenciales.

No es un medio apropiado para el cultivo a largo plazo de embriones bovinos en una incubadora de CO<sub>2</sub>.- Envasado en sobres de EVA con un puerto con septo para aguja y en tubos desechables de 8 ml.

Su vida útil es de 18 meses desde la fecha de fabricación, siempre que se utilice una técnica estéril y el almacenamiento recomendado es de 2 a 8 °C.(e)

### **1.10. Congelación**

Para cada célula hay un ritmo óptimo de enfriamiento por ende el ritmo de congelación condiciona la descongelación, mientras que el uso de crioprotectores hace que el agua salga a través de la membrana plasmática y se congela fuera de la célula, por lo tanto la célula se deshidrata.

El tiempo en el que se expone el ovocito al crioprotector es de 10 a 30 minutos lo cual permitirá una deshidratación adecuada la misma que reduce el riesgo de formación de cristales de hielo intracelulares que son nocivos para las células.(24)

Los rangos de congelación consisten en un descenso de temperatura a un ritmo de 0.3- 0.5 °C / min desde el momento en que comienza la formación de hielo que suele ser entre -5 y -9 °C hasta llegar a temperaturas de -33 y -40 °C y posteriormente pasar a nitrógeno líquido para evitar la formación intracelular de cristales de hielo se realiza el seeding, el cual consiste en que una vez estabilizada la pajilla a una temperatura de -5 y -9 °C se toca su pared con un objeto enfriado a -196°C y de este modo se cristaliza el líquido extracelular de manera controlada.(16)

### **1.11. Descongelación**

Para la descongelación del material genético (ovocitos) se debe tomar en cuenta las siguientes indicaciones:

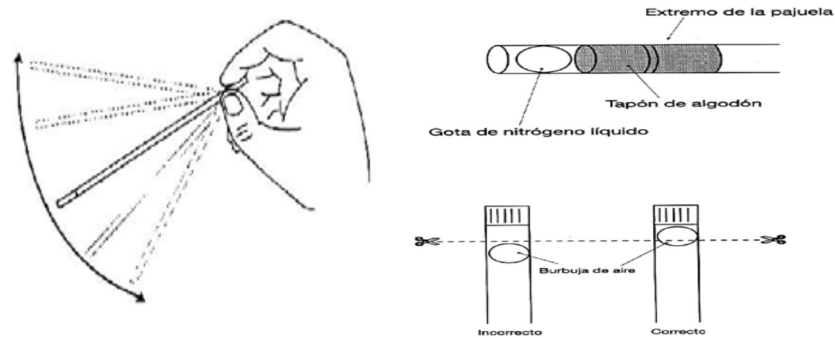
Luego de retirar la pajuela de la conservadora de nitrógeno líquido y antes de colocarla en el termo de boca ancha para su descongelación es conveniente sacudirla enérgicamente en un solo movimiento como quien desciende la temperatura de un termómetro clínico. (16)



Este movimiento ayuda a que se desprenda de la misma una gota de nitrógeno líquido que puede haber quedado en la parte posterior del tapón de algodón. Eliminar el nitrógeno reduce las posibilidades de "estallido" de la pajuela al ser colocada a baño maría para su descongelamiento.

Una vez que la pajuela ha sido descongelada, secada y antes de cortarla es conveniente nuevamente sacudirla con un movimiento seco tomándola desde el extremo a cortar, con la finalidad de que la burbuja de aire se desplace bien hacia dicho extremo.(17)

FIGURA 6. PASOS PARA LA DESCONGELACIÓN



FUENTE: Consejos prácticos producción animal 2000.(d)

## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

En este capítulo se detalla la metodología que se utilizó para realizar la presente investigación, también se describe las características, ubicación y el desarrollo de 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° 37'19.16" E.
- ❖ 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/2007

## **2.2. Materiales.**

Los materiales que más se utilizó son los siguientes:

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

- ❖ Papel Bond.
- ❖ Cd
- ❖ Libreta.
- ❖ Copias.
- ❖ Anillados.
- ❖ Empastados.
- ❖ Impresiones.

### ***2.2.2. Recursos tecnológicos***

- ❖ Calculadora.
- ❖ Cámara fotográfica.
- ❖ Flash Memori.
- ❖ Internet.

### ***2.2.3. Materiales de laboratorio***

- ❖ Guantes.
- ❖ Mascarillas
- ❖ Mandil.
- ❖ Ropa quirúrgica
- ❖ Estereomicroscopio (NIKON SMZ 745)
- ❖ Jeringuillas (5ml)
- ❖ Cloruro de sodio al 0.9%
- ❖ Micropipeta.
- ❖ Puntas desechables de micropipeta
- ❖ Cajas Petri
- ❖ Bisturí.
- ❖ Solución holding (minitub)
- ❖ Solución etilenglicol(minitub)
- ❖ Tubos de ensayo (BD Vacutainer)
- ❖ Gradillas
- ❖ Crioconservadora (Cryologic Freeze Control)
- ❖ Pajillas de 0.25
- ❖ Termo de nitrógeno líquido (SEMEX)
- ❖ Tapones de pajuelas de embriones

- ❖ Centrífuga (Centrifugue PLC series)

- ❖ Cofia

#### **2.2.4. Materiales de campo**

- ❖ Mandil

- ❖ Termo.

- ❖ Guantes.

#### **2.2.5. Animales:**

- ❖ 20 cuyes hembras de segundo parto.

## **2.3. Diseño de la Investigación**

### **2.3.1. Tipo de Investigación**

**DESCRIPTIVA:** La misma que consiste en la caracterización de un hecho o fenómeno con el fin de establecer su estructura o comportamiento.

### **2.3.2. Metodología**

**NO EXPERIMENTAL:** La misma que está basada en la manipulación de una variable no comprobada con el fin de describir la causa por la que se produce la situación o acontecimiento.

### **2.3.3. Métodos y Técnicas**

**ANALÍTICO –SINTÉTICO:** En el cual permite el análisis y la síntesis para llegar a un todo.

### **2.3.4. Análisis estadístico**

Esta investigación está representada porcentajes.

## 2.4. Desarrollo de la investigación

Para la realización de esta investigación se tomó en cuenta el siguiente protocolo que se describe a continuación:

- Recolección de ovarios de animales de matadero
- Una vez extraído los ovarios se coloca en un termo con cloruro de sodio al 0.9% con la finalidad de mantener intactas las estructuras.
- El tiempo de llegada al laboratorio con el material biológico es en el transcurso de 2 horas.
- Luego se procedió a retirar estructuras anexas de los ovarios como ligamentos, tejido adiposo, fascias.
- Se procede a cortar la superficie e interior de los ovarios en rebanadas transversas con bisturí número 20.
- Se realiza lavados retrógrados del ovario seccionado con solución holding y el contenido colocar en una caja Petri para luego observar y categorizar de la siguiente manera. TIPO A, B, C, una vez encontrados los ovocitos se procede a lavar en diversas gotas de holding colocadas en una caja Petri hasta que estén completamente limpios.
- En otra caja Petri colocar 3 a 4 gotas grandes de etilenglicol para proceder a realizar el llenado de la pajilla de 0.25 en el extremo del algodón. En el proceso de llenado se realiza de la siguiente manera en la que se absorbe un segmento de etilenglicol, se deja un espacio de aire, se absorbe los ovocitos, se deja un espacio de aire y otro segmento de etilenglicol para posteriormente sellar la pajilla con un tapón de embriones, pvc o bolitas.
- Luego se prende la Crioconservadora, se llena de nitrógeno líquido y se ubica en la curva 3 de congelación lenta la misma que debe marcar -6, es la temperatura óptima para colocar las pajillas previamente llenas y se espera 5 minutos y empieza la curva la misma que se demora 1 a 2 horas.
- Después de este transcurso de tiempo se puede sacar las pajillas desde -23 a -33°C para luego ser colocada en un termo de nitrógeno líquido.

## ***POST DESCONGELACIÓN***

Este proceso se realiza a los ocho días de haber crioconservado en el cual se verificó la calidad y la viabilidad de los ovocitos.

Siguiendo con el siguiente protocolo:

- Abrir el termo de nitrógeno líquido
- Elevar la canastilla sin sobrepasar de la boca del termo de nitrógeno líquido.
- Rápidamente con una pinza extraer la pajueta
- Cortar el extremo de la pajueta
- Sacudir con movimientos leves.
- Colocar el material en una caja Petri
- Observar al Estereomicroscopio y verificar la calidad de los ovocitos.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el presente capítulo se detalla los resultados obtenidos en la fase de experimentación, los análisis estadísticos y las representaciones gráficas de los mismos determinando la influencia de las variables: Número de ovocitos, calidad de ovocitos, estado de madurez, crioconservación y post descongelación.

#### 3.1. NÚMERO DE OVOCITOS RECOLECTADOS

**CUADRO 3. OVOCITOS RECOLECTADOS Y CATEGORIZADOS EN TRES TIPOS**

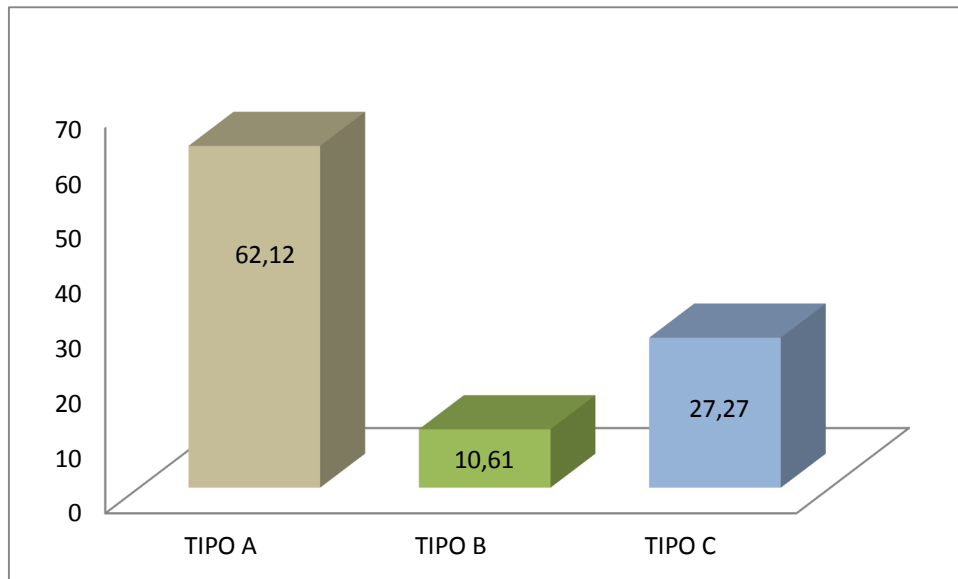
TOTAL DE OVOCITOS	TIPO A	TIPO B	TIPO C
66	41	7	18
PORCENTAJE (100%)	62,12	10,61	27,27

**FUENTE: Directa**

**ELABORADO: NARANJO, Diana**



## GRÁFICO 1. CALIDAD DE OVOCITOS



**FUENTE: Directa**  
**ELABORADO: NARANJO, Diana**

En el cuadro 3 y gráfico 1 en relación al número de ovarios recolectados se pudo obtener 66 ovocitos, los cuales se encuentran distribuidos de la siguiente manera.

Tipo A con un total de 41 ovocitos que corresponde al 62,12%

Tipo B con un total de 7 ovocitos que corresponde al 10,61%

Tipo C con un total de 18 ovocitos que corresponde al 27,27%

### 3.2. ESTADO DE MADUREZ

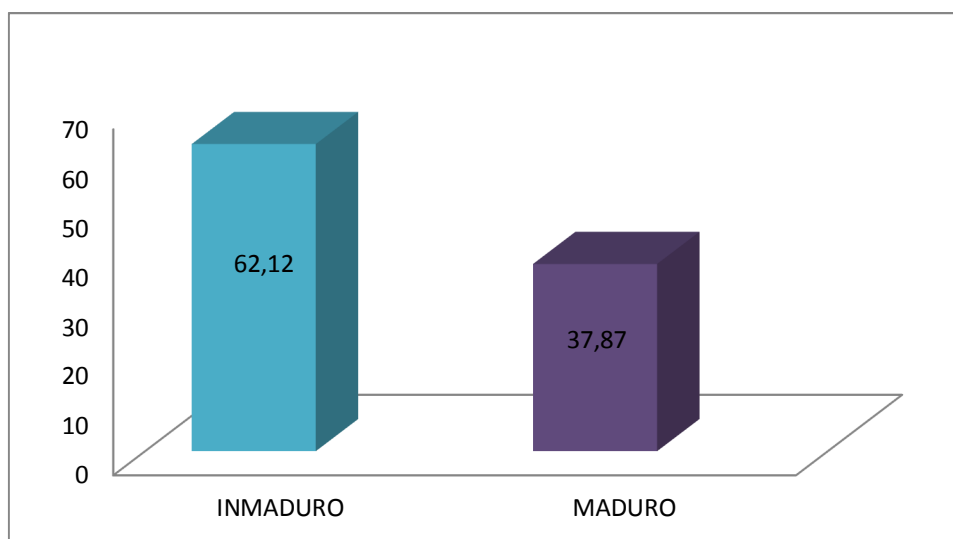
**CUADRO 4. ESTADOS DE MADUREZ DE LOS OVOCITOS**

ESTADOS DE MADUREZ	OVOCITOS	PORCENTAJE (100%)
Inmaduro	41	62,12
Maduros	25	37,87

**FUENTE: Directa**

**ELABORADO: NARANJO, Diana**

**GRÁFICO 2. ESTADO DE MADUREZ DE LOS OVOCITOS**



**FUENTE: Directa**

**ELABORADO: NARANJO, Diana**

En el cuadro 4 y gráfico 2 de acuerdo al estado de madurez se determina que: 41 ovocitos tipo A son inmaduros los mismos que representa un 62.12% y mientras que los 25 ovocitos tipo B y C son maduros los cuales representan un 37.87%.

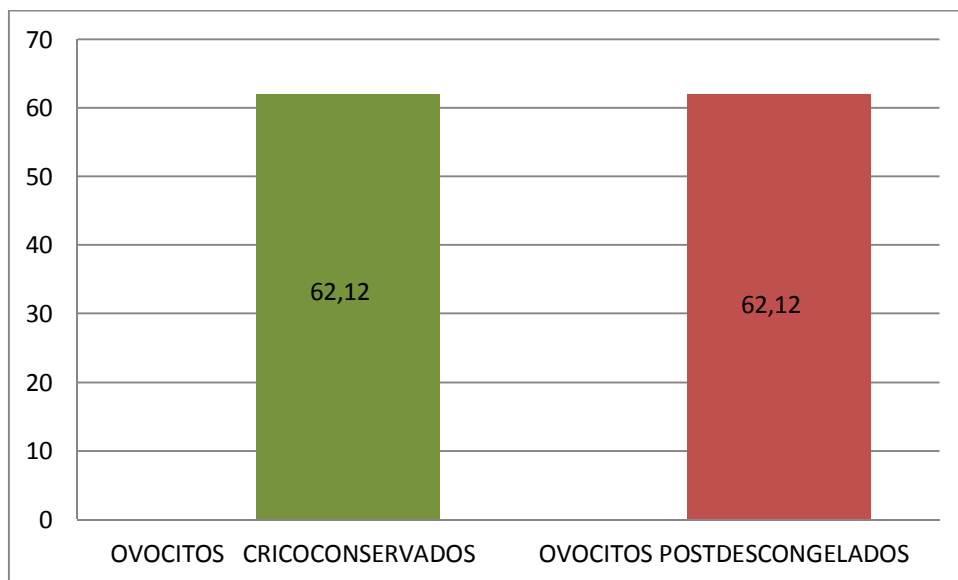
### 3.3. CALIDAD DE OVOCITOS CRICOCONSERVADOS Y POST DESCONGELADOS

**CUADRO 5. CALIDAD DE OVOCITOS CRICOCONSERVADOS Y POST DESCONGELADOS**

	OVOCITOS CRICOCONSERVADOS	OVOCITOS POSTDESCONGELACION
TOTAL	62,12	62,12

**FUENTE: Directa**  
**ELABORADO: NARANJO, Diana**

**GRÁFICO 3. CALIDAD DE OVOCITOS CRICOCONSERVADOS Y POST DESCONGELADO**



**FUENTE: Directa**  
**ELABORADO: NARANJO, Diana**

En el cuadro 5 y gráfico 3 se determina la calidad de los ovocitos tanto crioconservados como post descongelados, en los cuales se puede demostrar que 41 ovocitos Tipo A son crioconservados y durante la post descongelación se verificó que los mismos no causaron ninguna alteración y se mantuvieron en buena calidad.

## CONCLUSIONES

- ✓ En esta investigación se logró determinar la evaluación de la criopreservación de ovocitos en cuyes teniendo en cuenta que fue la primera investigación realizada en la cual hubo resultados exitosos.
- ✓ Los resultados de este estudio permiten destacar la importancia de criopreservar material genético de esta especie a fin en lo que favorecerá tanto a productores, técnicos y sobre todo a estudiantes que deseen realizar otros tipos de investigaciones.
- ✓ Dentro de los parámetros de calidad de los ovocitos se establece los siguientes resultados, de 40 ovarios procedentes de animales muertos se obtuvieron 66 ovocitos los mismos que son clasificados de acuerdo al: TIPO A: 41 ovocitos que corresponden al 62.12%, TIPO B: 7 ovocitos que corresponden al 10.61% y los de TIPO C: 18 ovocitos que corresponden al 27.27%.
- ✓ De acuerdo al estado de madurez se obtuvo los siguientes resultados, 41 ovocitos Tipo A son inmaduros los mismos que representan un 62.12%, mientras que los 25 ovocitos Tipo B y C son maduros con un porcentaje de 37.87%.
- ✓ Dentro de la criopreservación y post descongelación se determinó que 41 ovocitos Tipo A fueron criopreservados y pos descongelados los mismos que no provocaron ningún cambio y mantienen la misma calidad representando con un 62.12%.
- ✓ Se ha podido incrementar el material bibliográfico de la reproducción ya que se deja plasmado en este trabajo el protocolo de la evaluación y criopreservación de ovocitos en cuyes.

## RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda que sigan realizando más investigaciones reproductivas a fin a esta especie ya que es una buena alternativa para poder demostrar el verdadero potencial reproductivo para obtener germoplasma de esta especie.
- ✓ Para la realización de este tipo de investigaciones se debe tener toda la información necesaria debido a que si una técnica no es factible debemos acudir a otra y lograr el objetivo planteado.
- ✓ Se recomienda que para la evaluación de los ovocitos en cuyes no se debe centrifugar el material debido a que producen daños a nivel de la estructura del ovocito.
- ✓ Es necesario recalcar que para realizar todo trabajo de investigación en un laboratorio se debe utilizar todas las normas de bioseguridad.
- ✓ Mediante la crioconservación de germoplasma, principalmente ovocitos mediante congelación hizo posible el establecimiento de bancos que permiten preservar la variabilidad genética actual.

## REFERENCIAS CITADAS

1. AZADA, D.(2000). Criopreservación de Ovocitos y Fertilización in vitro en Bovinos (1ª Ed.). Pág. 150.ISBN: 698352124531
2. BONILLA, M. (2009). Reproducción Asistida. Abordaje en la Práctica Clínica. Editorial Médica Panamericana. (1ª Ed.). España. Pág. 100-115. ISBN: 9788498351569
3. CORREA, R.(2001).Razones y Estrategias para la Conservación de los Recursos Genéticos Animales. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.Pág. 33-42.ISBN:312589712
4. CONTRERAS, G.(2000).Reproducción Animal Métodos de Estudio. (2ª Ed.)Pág. 24-35. ISBN: 02534746.
5. GARDE, J. (2001). Nuevas Técnicas de Reproducción Asistida Aplicadas a la Producción Animal. Edición Servicio de Publicaciones de la Universidad de Castilla – La Mancha. (3ª Ed.). Pág. 59-65. ISBN: 848949231.
6. GOMEZ, A. (2003). Biología del Desarrollo. Editorial Médica Panamericana. (7ª Ed.). Pág. 239-243. ISBN: 9500608693.
7. GONZALEZ, R., Soto-Belloso, E., Delgado, N., Portillo, G., De Ondiz, A. y Velarde, J. (2000). Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados. Revista Científica- LUZ 2: 11-13.
8. GORDON, (2001). Técnicas de Reproducción y Biotecnologías. Editorial Médica Panamericana. (5ª Ed.). Pág. 59-60. ISBN: 95124547893.
9. GREENWALD and Roy, (2000). Reproducción Bovina/ Facultad de Medicina Veterinaria UNAM.

10. HAFEZ, B. (2002). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales (7ª Ed.). Pág. 542 -545. ISBN: 9701037197.
11. HERNANDEZ, A. (2006). Fisiología Reproductiva de los Animales. Editorial Médica Panamericana Madrid-España. (2ª Ed.). Pág. 98-100. ISBN: 8479039906.
12. HORVATH, S. (2008). La Vitrificación de Ovocitos Bovinos después del Tratamiento con Colesterol- Metil-beta-Ciclodextrina. Pág.66. ISBN: 7894563211
13. LAROCCA, C. (2002). Transferencia de Embriones y Área de Biotecnología de la Reproducción Animal. Facultad de Veterinaria de la Universidad de República de Montevideo .Libro electrónico 2011.Pág. 128-130.ISBN:456123784
14. LIM, P. (2000). Fertilización in vitro en Bovinos y Biotecnología de la Reproducción Animal. Pág. 70-75. ISBN: 50361849845
15. PALMA, G. MVZ, PhD.(2011). Biotecnología de la Reproducción. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Argentina.(3ª Ed.) Pág. 45-50. ISBN: 9874337796.
16. PEREZ, F. (2000). Fundamentos de la Reproducción. Editorial Médica Panamericana. (1º Ed.). España Pág. 269-277. ISBN:926908410
17. PICTON , ( 2001). Reproducción de Animales Domésticos. Producir XXI, Bs. As., 15(189); 43-46. Docentes Fac. Cs. Veterinarias UNR; Actividad Privada.
18. RIVERA GM, (2004). Desarrollo in vitro de ovocitos bovinos fecundados con espermatozoides adheridos al cumulus. Tesis de Licenciatura en Ciencias Veterinarias. Universidad Católica de Temuco. Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias. Escuela de Medicina Veterinaria. Temuco, Chile. 2004.

19. RODRIGUEZ, A. (2003). Bases de la Reproducción Animal. Editorial Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. (3ª Ed.). Pág. 208-210. ISBN: 8447207641.
20. ROLDÁN, E. (2000). Biotecnología de la Reproducción y Conservación de Especies en Peligro de Extinción Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), Madrid e Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (csic-uclm-jccm) Albacete pág. 58-79 .ISBN: 329512109850
21. ROZZI, R. (2001). Fundamentos de Conservación Biológica. Edición Fondo de Cultura Económica México. (2ª Ed.). Pág. 68-75 ISBN: 9681664280.
22. S.M. Giuliano; V.L. Trasoras // SPERMOVA (2011).Áreas de Física Biológica y Teriogenología, Instituto de Investigaciones y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Argentina. Pág. 1(1): 60-61. ISBN: 22239375
23. URBINA, M. (2009). Fertilidad y Reproducción Asistida. Editorial Médica Panamericana Caracas. Pág. 570-573. ISBN: 7521489363
24. Webb R y Col, (1999) .Metodos y Aplicaciones de la crioconservacion de oocitos y embrione en bovinos y en otros mamiferos. Instituto de Investigaciones Zootecnicas. Pag. 12 . ISBN: 043320729

### **REVISTAS:**

- A. Dr. Lars Johansson por su ayuda en la preparación de este manual. © Copyright MediCult a/s, Denmark, 2005.
- B. Manual de I.A. de C.I.A.V.T. Ed. Hemisferio del Sur (3ª Edición). Publicación de internet [www.selectsires.com](http://www.selectsires.com). Publicación en internet perteneciente a FONAIAP DIVULGA N°17 “Uso de la técnica de



Inseminación Artificial en bovinos” por el Med. Vet. Ramón Urdaneta y el Méd. Vet. Rafael Olivares.

- C. PRODUCCIÓN AGROPECUARIA/ Sanidad Animal, Mayo 2010, p. 41 – 44 Copyright © 2010. Universidad Nacional Experimental Sur del Lago.
- D. REV. FAC. AGRON. (luz). (2010). Evaluación del Desarrollo Embrionario de Ovocitos Bovinos Madurados y Fecundados in vitro obtenidos a partir de hembras mestizas. ISBN: 7456128910

### **BIBLIOGRAFÍA CITADA DE INTERNET:**

- a) <http://ddd.uab.cat/pub/tesis/2005/tdx-1125105-172638/td/17:25/22-10-2013>
- b) E-mail: [smgiulia@fvet.uba.ar](mailto:smgiulia@fvet.uba.ar)/14:45/25/10/2013
- c) RUIZ.[http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embionario/26-vitrificacion.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embionario/26-vitrificacion.pdf)/17:00/01-11-2013
- d) <http://www.tdx.cat/handle/10803/5729/17:45/01-11-2013>
- e) <http://www.unesur.edu.ve/unidades/investigacion/revistas.html/16:38/04-11-2013>

ANEXO 1. NUMERO DE OVOCITOS

NUMERO DE OVARIOS	TIPO A	TIPO B	TIPO C
1	1	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	1	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	1	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	1	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	1	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
TOTAL	5	0	0

FUENTE: Directa  
 ELABORADO: Naranjo, Diana

## ANEXO 2. NÚMERO DE OVOCITOS COLECTADOS

NUMERO DE OVARIOS	NUMERO DE OVOCITOS
1	3
2	3
3	4
4	3
5	3
6	3
7	4
8	4
9	2
10	3
11	3
12	2
13	2
14	3
15	3
16	3
17	4
18	3
19	3
20	3
TOTAL	61

FUENTE: Directa  
ELABORADO: Naranjo, Diana

ANEXO 3. OVOCITOS POR MÉTODO DE SLICING SIN  
CENTRIFUGACIÓN

NUMERO DE OVARIOS	TIPO A	TIPO B	TIPO C
1	2	1	1
2	4	2	1
3	3	0	1
4	4	0	1
5	4	2	1
6	4	2	1
7	2	0	1
8	2	0	2
9	0	0	0
10	2	0	0
11	0	0	2
12	2	0	0
13	0	0	1
14	0	0	0
15	2	0	2
16	0	0	0
17	3	0	1
18	0	0	0
19	2	0	3
20	0	0	0
TOTAL	36	7	18

FUENTE: Directa  
ELABORADO: Naranjo, Diana

ANEXO 4. CALIDAD DE OVOCITOS POST DESCONGELADO

OVARIOS	N° OVOCITOS	TIPO A	TIPO B	TIPO C
PAJILLA 1	5	5	0	0
PAJILLA 2	21	21	0	0
PAJILLA 3	15	15	0	0
TOTAL	41	41	0	0

FUENTE: Directa  
ELABORADO: Naranjo, Diana

# ANEXOS

FOTO 1. Extracción de ovarios



FOTO 2. Ovarios con cloruro de sodio al 0.9%



FOTO 3. Método de slicing



FOTO 4. Lavado con holding

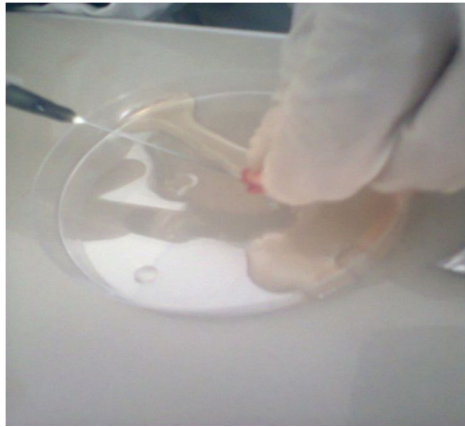


FOTO 5. Colocación en la caja Petri



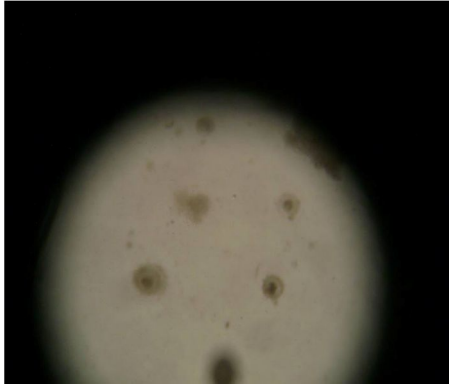
FOTO 6. Vista al Estereomicroscopio



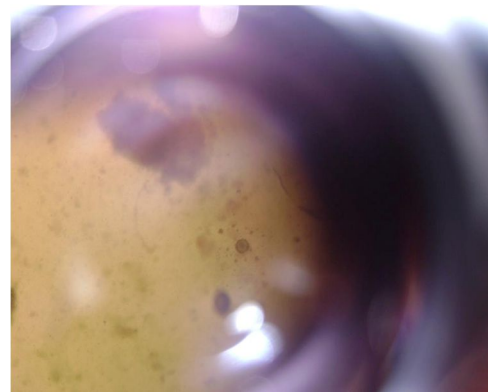
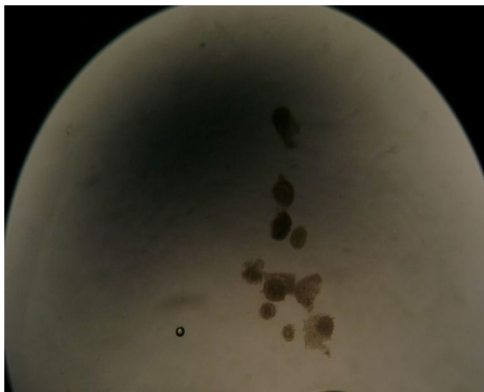


FOTO 7. Evaluación de calidad de los ovocitos

TIPO A



TIPO B



TIPO C

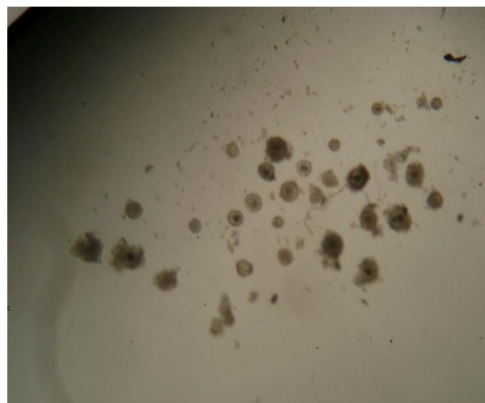
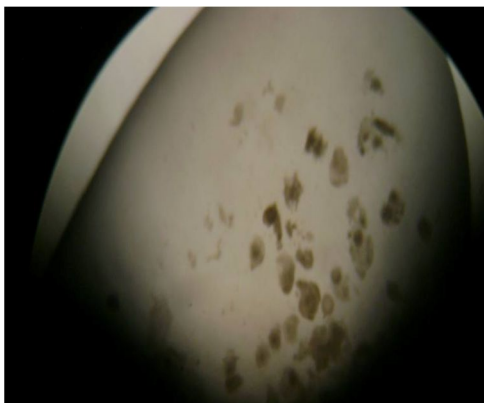


FOTO 8. Pajilla en la Crioconservadora



FOTO 9. Seeding



FOTO 10. Evaluación post descongelación

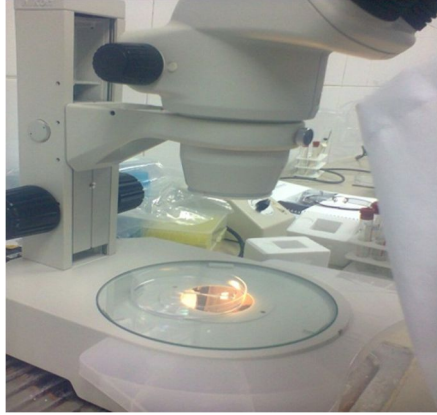


FOTO 11. Visita de tribunal

