

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y RECURSOS NATURALES.



CARRERA:

MEDICINA VETERINARIA

TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

TEMA:

**“EVALUACIÓN DE DOS CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y
PROPILENGLICOL) EN LA CONSERVACIÓN LENTA DE OVOCITOS EN
COBAYOS (*Cavia porcellus*) EN EL LABORATORIO DE LA CARRERA DE
MEDICINA VETERINARIA”.**

POSTULANTE: Kimberley Katuska Villamarín Álvarez

DIRECTORA: M.V.Z. Paola Jael Lascano Armas Mg.

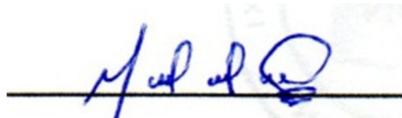
LATACUNGA – ECUADOR

2016

AUTORÍA

Yo, Kimberley Katuska Villamarín Álvarez, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo a la Universidad Técnica de Cotopaxi, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.



Kimberley Katuska Villamarín Álvarez

AUTOR

AVAL DIRECTOR DE TESIS

Cumpliendo con el Reglamento del Curso Profesional de la Universidad Técnica de Cotopaxi, en calidad de Directora de la Tesis con el Tema:

“EVALUACIÓN DE DOS CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y PROPILENGLICOL) EN LA CONSERVACIÓN LENTA DE OVOCITOS EN COBAYOS (*Cavia porcellus*) EN EL LABORATORIO DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA”. Propuesto por la egresada **Kimberley Katuska Villamarín Álvarez** con CI. 1501093478. Presento el **Aval Correspondiente** al presente trabajo, certificando que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones del presente documento.



M.V.Z. Paola Jael Lascano Armas Mg.

Directora de Tesis

AVAL MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Cumpliendo con el Reglamento del Curso Profesional de la Universidad Técnica de Cotopaxi, en calidad de Directora de la Tesis con el Tema:

“EVALUACIÓN DE DOS CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y PROPILENGLICOL) EN LA CONSERVACIÓN LENTA DE OVOCITOS EN COBAYOS (*Cavia porcellus*) EN EL LABORATORIO DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA”. Propuesto por la egresada **Kimberley Katuska Villamarín Álvarez** con **CI. 1501093478**. Presento el **Aval Correspondiente** al presente trabajo, certificando que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones del presente documento.

Aprobado por:

Dra. Blanca Mercedes Toro Molina Mg.

PRESIDENTA DEL TRIBUNAL



.....

M.V.Z Blanca Jeaneth Villavicencio Villavicencio

OPOSITOR DEL TRIBUNAL



.....

M.V.Z Cristina Isabel Bejarano

SECRETARIA DEL TRIBUNAL



.....

DEDICATORIA

Es mi deseo como sencillo gesto de satisfacción dedicar mi tesis en primera instancia al creador que me dio la fortaleza salud y esperanza para alcanzar este anhelo que se vuelve una realidad tangible. Siempre estuvo a mi lado y me doto de grandes dones y talentos que hoy puedo utilizar en mi vida.

A mis padres Arturo Villamarín y Miriam Álvarez por haberme apoyado en todo momento, con sus consejos, sus valores, sus motivaciones constantes que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanas Estefanía y Alisson quienes han estado conmigo en las grandes alegrías y son mi soporte en momentos inextricables.

A mi familia en general porque me han brindado en todo momento su apoyo incondicional con buenos consejos y muestras de afecto.

A mi enamorado y a su familia por la ayuda brindada en momentos oportunos.

A mis docentes que me han acompañado durante este largo camino brindándome su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando mi formación como médico veterinario zootecnista.

Finalmente a mis amigos por su alegría y transparencia de cristal con que me entregaron su amistad y a quienes he llegado a estimar inmensamente.

KIMBERLEY VILLAMARÍN

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios por haberme dado la sabiduría, el entendimiento y la fortaleza para llegar al final de mi carrera.

A la UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI por darme la oportunidad de estudiar y ser llegar a ser profesional. A mi directora de tesis, M.V.Z Paola Lascano por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado que pueda terminar mis estudios con éxito.

Agradezco a mis padres por haberme dado la vida y la oportunidad de llegar hasta donde estoy, a mis hermanas por apoyarme siempre con todos sus consejos y ánimos para seguir adelante.

En fin son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimos y compañía en los momentos más difíciles de mi vida.

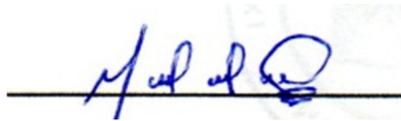
Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos. A todos ellos, muchas gracias.

KIMBERLEY VILLAMARÍN

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”.

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to read 'Kimberley Katuska Villamarín Álvarez'.

Kimberley Katuska Villamarín Álvarez

PRELIMINARES

Portada	i
Autoría	ii
Aval de la directora	iii
Aval de los miembros del tribunal	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Declaración expresa	vii
Preliminares	viii
Índice de contenido	iv
Índice de tablas	xiii
Índice de gráficos	xiv
Índice de anexos	vx
Índice de fotos	xvi
Resumen	xvii
Abstract	xviii
Aval de traducción	xix
Introducción	xx
Objetivo general	xxi
Objetivos específicos	xxi
Hipótesis	xxi

ÍNDICE

CAPITULO I

1.	REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1.	EL CUY	1
1.2.	ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTIVO DE LA HEMBRA	2
1.3.	FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA COBAYA	5
1.3.1.	Ciclo sexual	6
1.3.1.1.	Fase lútea	6
1.3.1.2.	Ciclo Estral	7
1.3.1.2.1.	Proestro	7
1.3.1.2.2.	Estro	8
1.3.1.2.3.	Metaestro	8
1.3.1.2.4.	Diestro	8
1.3.1.3.	Celo	8
1.3.1.4.	Color de la vulva	8
1.3.1.5.	La Ovulación	9
1.4.	FISIOLOGÍA OVARICA	9
1.4.1.1.	HEMBRA	9
1.4.1.1.1.	Ovogénesis	9
1.4.1.1.2.	Foliculogénesis	10
1.4.1.1.3.	Crecimiento Folicular	11
1.4.1.1.3.1.	Folículo primordial	12

1.4.1.1.3.2.	Folículo primario	13
1.4.1.1.3.3.	Folículo secundario o preantral	13
1.4.1.1.3.4.	Folículo terciario o Antral	13
1.4.1.1.3.5.	Folículo preovulatorio o de Graff	14
1.4.1.1.3.6.	Maduración del Óvulo	15
1.5.	OVOCITO	15
1.5.1.1.1.	Zona pelúcida	16
1.5.1.1.2.	Membrana plasmática	16
1.5.1.1.3.	Pronúcleo ovular	16
1.5.1.1.4.	Gránulos corticales	16
1.5.1.1.5.	Espacio perivitelino	17
1.5.1.2.	Clasificación de los Ovocitos	17
1.6.	ESTADO MADURATIVO DE LOS OVOCITOS	18
1.7.	MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE OVOCITOS	18
1.7.1.	Método de corte seriado	18
1.7.2.	Método de aspiración	19
1.8.	CRIOPROTECTORES	19
1.8.1.	Crioprotectores Permeables	19
1.8.1.1.	Etilenglicol	19
1.8.1.2.	Propilenglicol	20
1.9.	CONSERVACIÓN LENTA DE OVOCITOS	21
1.10.	ASPECTOS GENERALES DE LA TÉCNICA	22
1.10.1.	Nitrógeno Líquido	22
1.10.2.	Osmolaridad	22

CAPÍTULO II

2.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1.	UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.	23
2.1.1.	Ubicación Política.	23
2.1.2.	Ubicación Geográfica	23
2.1.3.	Datos Meteorológicos.	24
2.2.	RECURSOS MATERIALES.	25
2.2.1.	Materiales de oficina	25
2.2.2.	Recursos tecnológicos	26
2.2.3.	Materiales de laboratorio	26
2.3.	TIPO DE INVESTIGACIÓN.	27
2.3.1.	Experimental	27
2.3.2.	Explicativa.	27
2.4.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.	27
2.4.1.	Métodos	28
2.4.1.1.	Método Deductivo	28
2.4.1.2.	Método Inductivo	29
2.4.2.	Técnicas	29
2.5.	DISEÑO EXPERIMENTAL.	30
2.5.1.	t DE STUDENT	30
2.5.2.	UNIDADES EXPERIMENTALES	31
2.6.	MANEJO DEL ENSAYO	32
a)	Método de slicing.	33
b)	Evaluación de la cantidad, calidad y madurez de ovocitos.	33

c)	Post Descongelación	34
----	---------------------	----

CAPÍTULO III

3.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
3.2.	Calidad de los Ovocitos Pre Congelación.	36
3.3.	Madurez de los Ovocitos Pre Congelación.	38
3.4.	Calidad de los Ovocitos Post Descongelación.	40
3.5.	Evaluación de los dos Crio protectores.	42
3.6.	Interpretación Tabla t de Student	44
	CONCLUSIONES	46
	RECOMENDACIONES	47
	BIBLIOGRAFÍA	48
	ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: ÓRGANOS REPRODUCTORES DE LA HEMBRA Y SUS FUNCIONES	5
TABLA 2: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LOS FOLÍCULOS OVÁRICOS	12
TABLA 3: DISTRIBUCIÓN DE TRATAMIENTOS	31
TABLA 4: OVOCITOS RECOLECTADOS Y CATEGORIZADOS	35
TABLA 5: CALIDAD DE OVOCITOS PRE CONGELACIÓN.	36
TABLA 6: MADUREZ DE LOS OVOCITOS PRE CONGELACIÓN.	38
TABLA 7: CALIDAD DE LOS OVOCITOS POST DESCONGELACIÓN.	40
TABLA 8: EVALUACIÓN DE LOS DOS CRIOPROTECTORES.	42
TABLA 9: T STUDENT DE LA CALIDAD DE OVOCITOS POSCRIOCONSERVACION.	44

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: APARATO REPRODUCTIVO DE LA COBAYA.	2
GRÁFICO 2; ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL OVARIO	3
GRÁFICO 3: CICLO ESTRAL	7
GRÁFICO 4: ESQUEMA DE LA OVOGÉNESIS	10
GRÁFICO 5: ESQUEMA FOLICULAR	14
GRÁFICO 6: DESARROLLO FOLICULAR	14
GRÁFICO 7: ESTRUCTURA DEL OVOCITO	15
GRÁFICO 8: TIPOS DE OVOCITOS POR SU CALIDAD	17
GRÁFICO 9: ETILENGLICOL	20
GRÁFICO 10: PROPILENGLICOL	21
GRÁFICO 11: UBICACIÓN GEOGRÁFICA	24
GRÁFICO 12: CROQUIS DEL LUGAR	25
GRÁFICO 13: CALIDAD DE OVOCITOS PRE CONGELACIÓN.	37
GRÁFICO 14: MADUREZ DE LOS OVOCITOS PRE CONGELACIÓN.	39
GRÁFICO 15: CALIDAD DE LOS OVOCITOS POST DESCONGELACIÓN.	41
GRÁFICO 16: EVALUACIÓN DE LOS DOS CRIOPROTECTORES.	43
GRÁFICO 17: DE LA DIFERENCIA DE T STUDENT POSCRIOCONSERVACION.	45

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. NÚMEROS DE OVOCITOS RECOLECTADOS	54
ANEXO 2. CANTIDAD DE OVOCITOS INMADUROS	54
ANEXO 3. COLECCIÓN DE OVOCITOS SEGÚN SU CALIDAD	55
ANEXO 4. CALIDAD DE OVOCITOS POST DESCONGELADO	55
ANEXO 5. IMÁGENES DE LAS PRÁCTICAS	56

ÍNDICE DE FOTOS

FOTO 1.	MATERIALES	56
FOTO 2.	CRIOCONSERVADORA	56
FOTO 3.	CRIOPROTECTORES	56
FOTO 4 .	COBAYAS HEMBRAS	57
FOTO 5.	APARATO REPRODUCTOR FEMENINO	57
FOTO 6.	IDENTIFICACION DE LOS OVOCITOS	57
FOTO 7.	MÉTODO DE SLICING.	57
FOTO 8.	LAVADOS RETRÓGRADOS DE EL OVARIO.	58
FOTO 9.	APLICACIÓN DE SOLUCIÓN HOLDING.	58
FOTO 10.	EVALUACIÓN DE LOS OVOCITOS A, B, C.	58
FOTO 11.	SELECCIÓN DE LOS OVOCITOS DE CALIDAD A.	58
FOTO 12.	LAVADO DE LOS OVOCITOS.	59
FOTO 13.	LLENADO DE LA PAJILLA.	59
FOTO 14.	ENCENDER EL CRYOBATER EN UNA CURVA #3.	59
FOTO 15.	COLOCACIÓN DE LAS PAJILLAS.	59
FOTO 16.	TRASLADO DE LAS PAJILLAS	60
FOTO 17.	SACADO DE LAS PAJILLAS	60
FOTO 18.	DESCONGELADO DE LA PAJILLA	60
FOTO 19.	EVALUACION POST	60
FOTO 20.	VISITA DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL	61

TEMA: “EVALUACIÓN DE DOS CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y PROPILENGLICOL) EN LA CONSERVACIÓN LENTA DE OVOCITOS EN COBAYOS (*Cavia porcellus*) EN EL LABORATORIO DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA”.

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi. Los ovocitos en estudio se extrajeron de 30 hembras cobayas de 2do parto, las mismas que fueron sacrificadas y de las cuales se tuvo un total de 420 ovocitos para la crioconservación, estos ovocitos se recolectaron en recipientes estériles con agua bidestilada para el mantenimiento fresco de los ovarios, evitando que se produzca daños a nivel de las estructuras. El objetivo de esta investigación fue la evaluación de dos crioprotectores (etilenglicol y propilenglicol) para la conservación lenta de ovocitos de cuyes (*cavia porcellus*), donde se utilizó la técnica de slicing (corte de ovario), el cual consiste en realizar finos cortes separados en la superficie del ovario extrayendo el líquido folicular, el cual permitió determinar la calidad, cantidad y madurez de los ovocitos extraídos mediante microscopía evidenciando su viabilidad. Así mismo se pudo identificar cuál de los dos crioprotectores es el ideal para la crioconservación de los ovocitos de cobayas hembra estableciendo los parámetros de calidad antes y después de la congelación. El análisis estadístico de esta investigación está basado en porcentajes (100%) y se obtuvo los siguientes resultados de 420 ovarios se obtuvo 226 ovocitos categorizados en: Tipo A con un 53.8%, Tipo B con un 23% y Tipo C con un 23% y de acuerdo al estado de madurez se determina que el 53.80% corresponden a inmaduros y el 43% corresponden a maduros, mientras que los ovocitos crio conservados con etilenglicol y post descongelados representan un 97.34% en calidad A y los ovocitos crio conservados con Propilenglicol y post descongelados representan un 69.91%, concluyendo que el crioprotector ideal para la conservación de ovocitos de cobayas es el Etilenglicol ya que es superior al crioprotector Propilenglicol el cual presentó más pérdidas de ovocitos al descongelamiento.

TITLE: "EVALUATION OF TWO CRYOPROTECTANTS (ETHYLENE GLYCOL AND PROPYLENE GLYCOL) IN SLOW CONSERVATION OF OOCYTES IN GUINEA PIGS (*Cavia porcellus*) IN THE LABORATORY OF VETERINARY MEDICINE".

ABSTRACT

This research was done in the laboratory of biotechnology of the reproduction of the Technique University of Cotopaxi . The Oocytes in study had extracted of 30 females guinea pigs of 2nd childbirth, the same that were sacrificed and of which had a total of 420 oocytes cryopreservation , these oocytes were collected in sterile containers with doubly distilled water for fresh maintenance of ovaries, avoiding cause damage to the structures. The purpose of this study was the evaluation of two cryoprotectants (ethylene glycol and propylene glycol) for the conservation slow of oocytes from Guinea pig (*cavia porcellus*), where it was used the technique of slicing (cutting of ovary), which consists in carrying out of fine cuts separated on the surface of the ovary by extracting follicular fluid, which allowed to determine the quality, amount and maturity of the oocytes extracted by microscopy demonstrating its viability. For this reason can be identified which of the two cryoprotectants is ideal for the Cryopreservation of oocytes of Guinea Pigs female to establishing the parameters of quality before and after freezing. The statistical analysis of this research is based on percentages (100%) which had permitted to obtain the following results of 420 ovaries were 226 oocytes categorized in: type A with a 53.8%, 23% type B and type C with 23% and according to the stage of maturity is determined that the 53.80% are immature and 43% correspond to mature, while the oocytes Cryo preserved with ethylene glycol and post thawed represent a 97.34% on quality and the oocytes Cryo preserved with propylene glycol and thawed post represent a 69.91%, concluding that the ideal cryoprotectant for the conservation of Guinea pigs is the ethylene glycol which is superior to the propylene glycol cryoprotectant which present more lost to thawing oocytes.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y RECURSOS NATURALES
Latacunga – Ecuador

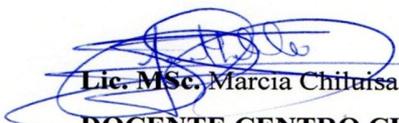
AVAL DE TRADUCCIÓN

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 la señorita Egresada de la Carrera de **MEDICINA VETERINARIA** con el tema: “**EVALUACIÓN DE DOS CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y PROPILENGLICOL) EN LA CONSERVACIÓN LENTA DE OVOCITOS EN COBAYOS (CAVIA PORCELLUS) EN EL LABORATORIO DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**”, 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, Febrero del 2016

Atentamente,


Lic. MSc. Marcia Chituiza

DOCENTE CENTRO CULTURAL DE IDIOMAS

C.C. 0502214307

INTRODUCCIÓN

Dentro de las biotecnología de la reproducción se cuenta con herramientas capaces de manipular y modificar el genoma de los seres vivos como son los animales mamíferos ya que con el desarrollo de nuevas biotecnologías se puede producir animales transgénicos o la multiplicación in vitro de líneas de animales genéticamente superiores permitiendo así el avance de las técnicas de recuperación de material genético.

En la última década los ovocitos recuperados de ovarios de mataderos se han convertido en una fuente ampliamente utilizada para procedimientos tales como la fecundación in vitro, la clonación u otras tecnologías reproductivas relacionadas. Debido a que el ovocito solo permanece viable un periodo limitado de tiempo y a que el número de ovocitos que puede ser recogido en un día determinado es reducido, la capacidad para mantener a los ovocitos crioconservados incrementaría enormemente su utilidad en la investigación básica así como en las aplicaciones comerciales.

Sin embargo y hasta la fecha, la capacidad de desarrollo de los ovocitos que han sido congelados, medida como el número de embriones viables por ovocitos congelado, se mantiene baja comparada con la obtenida a partir de ovocitos frescos.

En la actualidad ya es posible crioconservar ovocitos y embriones de algunas especies de mamíferos mediante los protocolos de congelación lenta, congelación rápida y vitrificación, sin embargo, en la producción de cobayos (*Cavia Porcellus*) la aplicación de biotecnologías de la reproducción y algunos protocolos no están muy avanzados.

Es por ello que en esta investigación se plantea los siguientes objetivos e hipótesis.

OBJETIVOS

General

- Evaluar dos crioprotectores (etilenglicol y propilenglicol) en la conservación lenta de ovocitos en cobayos (*Cavia porcellus*) mediante la utilización del laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria.

Específicos

- Determinar la calidad, cantidad y madurez de los ovocitos extraídos mediante microscopia para evidenciar su viabilidad.
- Identificar cuál de los dos crioprotectores es el ideal para la crioconservación de los ovocitos de cobayos hembra.
- Comparar resultados de crioprotectores en los ovocitos de calidad I mediante microscopia identificando su eficiencia en la crioconservación.

HIPOTESIS

H. Alternativa

Hi: Se logrará establecer diferencia entre los dos crioprotectores en la crioconservación de ovocitos de cobayos hembra.

H. Nula

Ho: No se logrará establecer diferencia entre los dos crioprotectores en la crioconservación de ovocitos de cobayos hembra

CAPITULO I

1. REVISIÓN DE LITERATURA

El presente capítulo trata de las principales características anatomofisiológicas del aparato reproductor de la hembra cobaya, la fisiología ovárica, la extracción de los ovarios y las características de los crioprotectores utilizados en la investigación.

1.1. EL CUY

El cuy es proveniente de los Andes y es considerado como una de las fuentes más importantes de proteína animal para los pobladores rurales. De acuerdo a los análisis realizados por el Ministerio de Salud, su carne es de muy buena calidad, ya que contiene 20.3 % de proteína y sólo 7.8 % de grasa. (BUSTAMANTE, 2014)

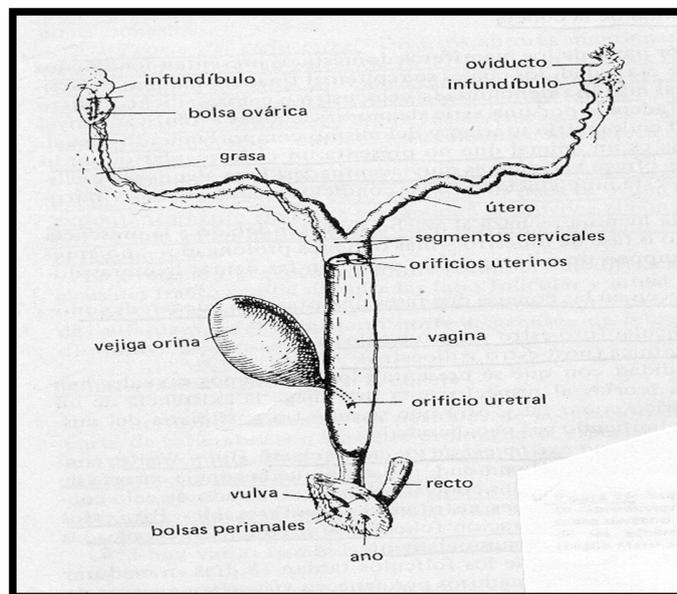
Son una clase de vertebrados amniotas homeotermos (de "sangre caliente"), con pelo y glándulas mamarias productoras de leche con la que alimentan a las crías. La mayoría son vivíparos. (LOPEZ, 2012)

1.2. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTIVO DE LA HEMBRA

Los órganos del aparato reproductor femenino (de la hembra) incluyen ovarios, oviductos, el útero, el cuello uterino, la vagina y los genitales externos. Los órganos genitales internos (el primero de cuatro componentes) están sostenidos por el ligamento ancho. Este ligamento consta del mesoovario, que sostiene al ovario: el mesosálpinx, que sostiene al oviducto; y el mesometrio, que sostiene al útero. (HAFEZ, 2002)

El aparato genital del cuy hembra está formado por los ovarios y el útero, que desemboca en la vagina. Externamente la vagina presenta un pliegue característico en forma de “y” invertida, totalmente distinto del pliegue longitudinal del macho. (PEREZ, 2004)

GRÁFICO 1: APARATO REPRODUCTIVO DE LA COBAYA.



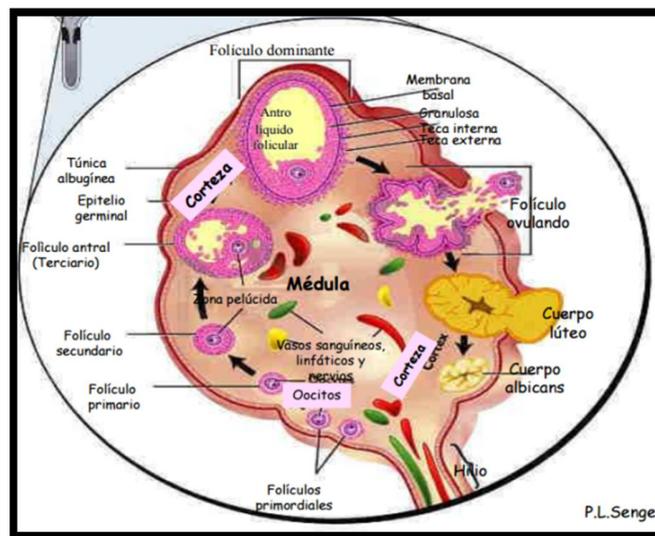
Fuente: (CAMPESINOS, 2002)

El sistema reproductor femenino consta de:

1.2.1 Ovario

Los ovarios son pequeños, de menor tamaño que un frijol. Tienen la función de producir los óvulos, para la reproducción de la especie. Además funcionan como glándulas en donde se producen los estrógenos y la progesterona. (LOPEZ, 2000)

GRÁFICO 2; ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL OVARIO



Fuente: (LÓPEZ, 2010)

1.2.2 Oviductos

Los oviductos (o tubas uterinas) son órganos pares del tracto reproductor femenino en los que se llevan a cabo funciones esenciales para la reproducción como son: el transporte de los gametos, la capacitación espermática, la segmentación embrionaria

y el transporte sincronizado del embrión hacia el útero para su posterior anidación. (PEREZ, y otros, 2001)

1.2.3 Útero

Presenta útero bicorneo en forma de V. Los cuernos uterinos miden en su parte medio 6 mm y de longitud tienen 37 mm. (OÑATE, 2008)

1.2.4 Cuernos uterinos y Cuerpo uterino

Ambos forman una V con su vertice posterior y extremos anterior, tienen forma conica, un poco alizados, aproximadamente miden 37 m.m de largo y 6 m.m de ancho. El Cuerpo Uterino es corto y aplanado dorso ventralmente, aproximadamente mide 13 m.m de largo y 7 m.m de ancho. El Cuello Uterino es una porcion del utero que se comunica con la vagina, en cuyo centro se halla el orificio comunicante, su consistencia es dura, formada por una estructura muscular gruesa (esfinter o anillo). (OÑATE, 2008)

1.2.5 Vagina

Es un tubo de músculo fibro elástico, su longitud es de 3 mm. Por 1 cm de ancho, se encuentra ubicada en la cavidad pelviana. (ORTIZ, 2013)

1.2.6 Vulva

Junto al ano, una abertura externa en forma de Y invertida, con sus dos ramas en posición ventral que corresponde en si al orificio vulvar. Este orificio en su posición media y ventral, presenta una escotadura fuertemente pronunciada, que forma dos pequeños labios en cuyo fondo se encuentra el meato urinario que presenta un aspecto semejante al esfínter anal. (JIMENEZ, 2005)

TABLA 1: ÓRGANOS REPRODUCTORES DE LA HEMBRA Y SUS FUNCIONES

ÓRGANO	FUNCIONES
Ovarios	Producción de ovocitos.
	Producción de estrógenos (folículos de Degraff).
	Producción de progestágenos (cuerpo lúteo).
Oviductos	Transporte de gametos (espermatozoides y óvulos).
	Sitio de fertilización.
Úteros	Retención y alimentación de embrión y feto.
	Previene la contaminación microbiana del feto.
Cérvix	Reservorio para el semen y transporte de esperma.
	Órgano copulador.
Vagina	Sitio de depósito de semen durante el apareamiento natural.
	Conducto del parto.
Vulva	Abertura externa del aparato reproductor.

Fuente: (CARAVACA, 2005)

1.3. FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA COBAYA

La Pubertad es el período en el que el animal inicia su vida sexual y manifiesta desarrollo definitivo en sus órganos reproductivos. La edad adecuada para iniciar el apareamiento es de 3 – 4 meses, cuando han madurado sexualmente y han alcanzado un peso mínimo de 600 g. esto garantiza que el animal también ha completado su crecimiento alcanzando su tamaño adulto. Si se destina una cuya más joven a reproducir, su crecimiento cesará por completo después del parto, y se quedara pequeña. (CADENA, 2000)

Es la edad en que aparece el primer celo, y está influenciada por el peso del animal resultado de su manejo y carga genética. La pubertad en los cuyes hembras suele presentarse a la edad de 50 a 70 días y en los machos a los 50 días, por eso hay que criarlos separado hasta la edad de empadre. (PAJARES, 2009)

1.3.1. Ciclo sexual

La reproducción es una actividad biológica que permite la continuidad de la especie. Las hembras son policíclicas, en los cuales, los ciclos estrales se repiten durante todo el año, con una periodicidad muy característica en la especie cavia. (SOSA, 2002).

Se reconocen en la cobaya la fase

1.3.1.1. Fase lútea

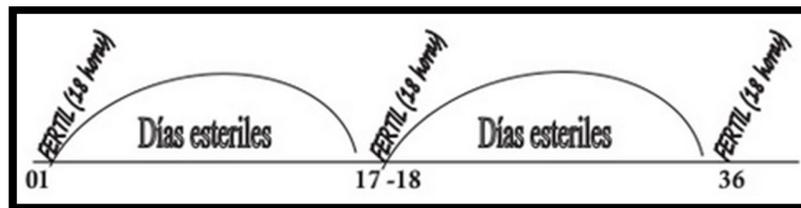
Fase Lútea: dura 12-13 días de los 16 días del ciclo.

En un ciclo natural, la fase lútea corresponde a la presencia de un cuerpo lúteo activo en el ovario, el cual secreta progesterona y bloquea una nueva ovulación. Cuando el cuerpo lúteo regresa naturalmente, la secreción de progesterona cae y el retrocontrol negativo que ejerce sobre el hipotálamo desaparece. Entonces se estimula la secreción de FSH y LH por la hipófisis, lo que provoca el desarrollo de una nueva onda folicular y la ovulación. Al mantener alto el nivel de progesterona en el organismo de las hembras, se bloquean las nuevas ovulaciones consecutivas de la regresión de los cuerpos lúteos. En un ciclo natural la mucosa uterina secreta prostaglandinas $PGF2\alpha$, que provoca la lisis del cuerpo lúteo del ovario, la concentración de progesterona en la sangre disminuye provocando así la ovulación y un nuevo ciclo puede empezar. (GREGOIRE, 2010)

1.3.1.2. Ciclo Estral

El cuy es una especie poliestrica con pequeñas variaciones de fecundidad. El ciclo estrual del cuy tiene una duración promedio de 16 días con un rango de 13 a 22 días, en este ciclo se presentan cuatro fases. (SOSA, 2002).

GRÁFICO 3: CICLO ESTRAL



Fuente: (MAMANI, 2013)

- La fase de proestro, dura 1-1.5 días
- La fase de estro, dura 8-11 horas
- La fase de metaestro, dura 1-1.5 días
- La fase de diestro, dura 13-15 días
-

La membrana vaginal está presente en la periferie de los genitales de la hembra y se ausenta por 3 a 7 días (4.1 días en promedio) coincidiendo con la etapa de celo. La ovulación ocurre 1 a 1.5 días posteriores a la apertura vaginal. Esta especie tiene 3.14 ovulaciones en promedio por ciclo estrual, pudiendo llegar hasta 8 ovulaciones por ciclo. (ARANIBAR, 2014)

1.3.1.2.1. Proestro

En esta fase se incrementa la acción de los órganos reproductores y tiene una duración promedio. (ARGOS, 2014)

1.3.1.2.2. Estro

Esta fase tiene una duración promedio de 10 horas y es donde la hembra acepta voluntariamente al macho. (ARGOS, 2014)

1.3.1.2.3. Metaestro

Tiene una duración aproximada 24 horas, después del cual la hembra rechaza al macho; aquí se inicia el crecimiento del cuerpo lúteo y el útero adquiere ciertas características fisiológicas para permitir la implantación del óvulo fecundado. (ARGOS, 2014)

1.3.1.2.4. Diestro

Es la llamada fase de reposo o descanso, su tiempo de duración es más largo que las otras fases, durando aproximadamente de 13 a 15 días. (ORIBE, 2004)

1.3.1.3. Celos

Se denomina celo o estro a la fase del ciclo estral en que las hembras aceptan al macho, la duración o persistencia del celo en esta especie varía entre 27 y 31 horas. Además tiene la característica de presentar el celo post parto que dura 3 horas, apareciendo aproximadamente a las dos horas después del parto; una evidencia para notar el celo es cuando las hembras intentan montar a otras. (ORIBE, 2004)

1.3.1.4. Color de la vulva

Si la hembra se encuentra en celo se notará la vagina ligeramente enrojecida y con los labios vulvares brillantes y lubricados. (CAMPESINOS, 2013)

1.3.1.5. La Ovulación

La ovulación en cuyes es espontánea y ocurre 10h después de iniciado el celo, los óvulos tienen aproximadamente 15h de vida a diferencia de los espermatozoides que viven 30h. Inmediatamente después del parto, de 3 o 4h se produce un celo con ovulación, lo cual hace fértiles a las hembras, existiendo en consecuencia madres lactantes y gestantes a la vez. (PAJARES, 2009)

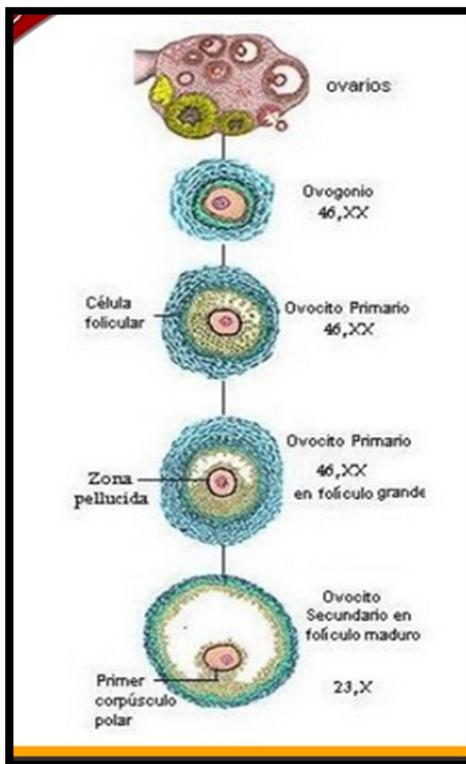
1.4. FISIOLÓGÍA OVARICA

1.4.1.1. HEMBRA

1.4.1.1.1. Ovogénesis

La ovogénesis es la gametogénesis femenina, es decir, el desarrollo y diferenciación del gameto femenino u óvulo mediante una división meiótica y se lleva a cabo en los ovarios. Este proceso se produce a partir de una célula diploide y se forman como productos una célula haploide funcional (el óvulo) y tres células haploides no funcionales (los cuerpos polares). Las células del organismo poseen una dotación genética compuesta por 46 cromosomas. Las células germinales poseen sólo 23. Al unirse tras la fecundación un ovocito con 23 cromosomas y un espermatozoide con 23 cromosomas darán lugar a un embrión con células de 46 cromosomas. (ESIMER, 2011)

GRÁFICO 4: ESQUEMA DE LA OVOGÉNESIS



Fuente: (BEDÓN, 2011)

1.4.1.1.2. Folliculogénesis

La Folliculogénesis es un proceso altamente selectivo donde usualmente solo un folículo asume dominancia y el destino del resto de los folículos es la atresia mediada por apoptosis. La Folliculogénesis, hasta la etapa en que se forma el antro folicular, es independiente de la hormona folículo estimulante (FSH) y se ha confirmado que la fase inicial de la Folliculogénesis es estimulada por otros factores, mientras que el folículo antral requiere de gonadotropinas. El proceso gradual de desarrollo y diferenciación de un folículo, desde una estructura primordial hasta el folículo preovulatorio, toma aproximadamente 8 semanas en roedores. (ESPINOZA, y otros, 2007).

1.4.1.1.3. Crecimiento Folicular

En el crecimiento folicular intervienen la proliferación y la diferenciación (inducidas por hormonas) de células de la teca y de la granulosa, lo que finalmente causa un incremento en la capacidad de los folículos de producir estradiol y de reaccionar a las gonadotropinas. (HAFEZ, B, 2000).

El desarrollo folicular ovárico en los animales domésticos durante un ciclo estral sigue un patrón de dos o tres oleadas o grupos de folículos que crecen. En ese proceso están identificados tres eventos fisiológicos: el reclutamiento, la selección y la dominancia que ejerce el folículo de mayor tamaño sobre los subordinados. (ESPINOZA, y otros, 2007).

En cada oleada folicular es reclutado un grupo de folículos primordiales que posteriormente crecen. La selección del folículo dominante ocurre al final de la fase común de crecimiento. El folículo dominante continúa creciendo a una tasa constante y el resto de los folículos sufren atresia. La desviación folicular es un concepto relativamente nuevo y se refiere al inicio de una diferencia notoria en la tasa de crecimiento entre los dos folículos más grandes presentes en el ovario de hembras. (ESPINOZA, y otros, 2007).

**TABLA 2: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y
BIOQUÍMICOS DE LOS FOLÍCULOS OVÁRICOS**

COMPONENTES	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS/FISIOLÓGICAS
Folículo primordial	Folículos con oocitos localizados en el centro/una sola capa de células de la granulosa. Se diferencian a partir de células germinales primordiales (oogonios) y permanecen en una profase meiotica suspendida hasta que reanudan su maduración/ovulación y atresia. Crecimiento folicular, proliferación de células de granulosa, formación de la zona pelúcida, diferenciación de células de la teca.
Folículo secundario	Aumenta el número de las células de la granulosa por mitosis; dichas células se hacen cuboides.
Folículo vesicular	Folículos en los que se acumula líquido folicular en el antro dentro de las células epiteliales.

Fuente: (CASTAÑEDA, 2009)

1.4.1.1.3.1. Folículo primordial

Folículo Primordial (oocito rodeado por una sola capa de células de la pregranulosa de forma aplanada), están formadas por una capa plana de células foliculares epiteliales, que en estadios más tardíos de su diferenciación, se transforman en células de la teca interna. Los folículos contienen la célula huevo u ovocito. (HORST, 2005).

1.4.1.1.3.2. Folículo primario

Folículo Primario (caracterizado por un oocito rodeado por una sola capa de células de la granulosa de forma cuboidal), En esta etapa el ovocito comienza a rodearse de una capa celular amorfa de glicoproteínas denominada zona pelúcida. Las células de la teca interna comienzan a rodear por fuera a las células de la granulosa. 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. (HAFEZ, B, 2000)

1.4.1.1.3.3. Folículo secundario o preantral

Folículo Preantral (conformado por un oocito rodeado por dos a siete capas de células de la granulosa y por las células de la teca), cuando las células foliculares están en plena división mitótica. Los folículos secundarios contienen aproximadamente 2 capas de células. (MELLISHO, 2010)

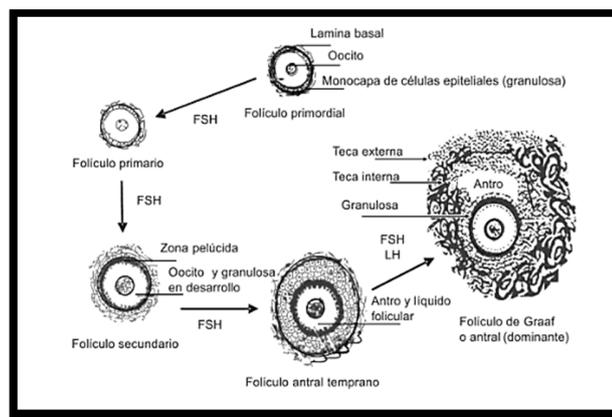
1.4.1.1.3.4. Folículo terciario o Antral

Folículo Antral (caracterizado por la presencia de una cavidad folicular: Antro), Los folículos terciarios o antrales son caracterizados por la presencia de cavidad conocida como antro. Se caracterizan histológicamente por la presencia de la cavidad antral y por estar rodeados de varias capas cúbicas de células de la granulosa que comienzan a secretar un trasudado que se denomina líquido folicular, que al acumularse produce un reordenamiento de las mismas en células del cúmulo y murales. (GIGLI, y otros, 2006)

1.4.1.1.3.5. *Folículo preovulatorio o de Graff*

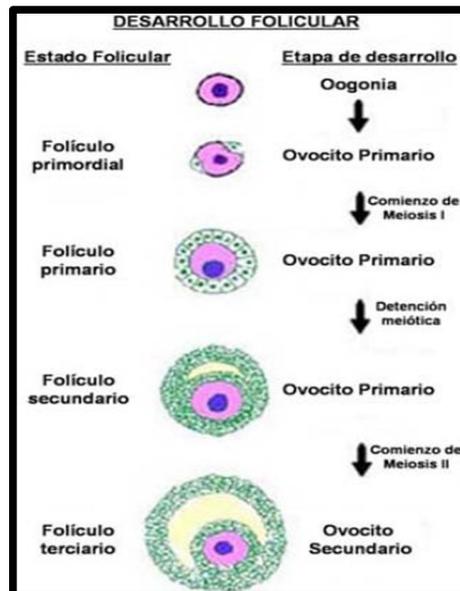
Folículo Preovulatorio (máximo crecimiento folicular, el cual contiene un oocito detenido en profase I que continuara su meiosis después del pico de hormonas gonadotrópicas FSH y LH. (MELLISHO, 2010).

GRÁFICO 5: ESQUEMA FOLICULAR



Fuente: (ÁLVAREZ, 2009)

GRÁFICO 6: DESARROLLO FOLICULAR



Fuente: (CARDENAS, 2011)

1.4.1.1.3.6. Maduración del Óvulo

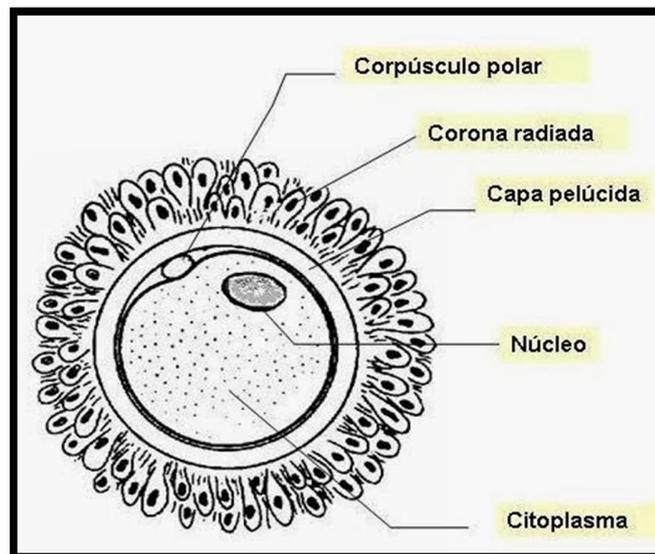
La maduración de los oocitos comprende dos etapas:

- a.- Un periodo de crecimiento
- b.- Un periodo final de preparación nuclear y citoplásmica que constituye un prerrequisito para la fecundación y el desarrollo normal. (SCOTT, 2005).

1.5. OVOCITO

Célula germinal femenina que está en proceso de convertirse en un óvulo maduro. Para ello, será necesario que realice un complejo proceso de división celular llamado meiosis con la finalidad de reducir su dotación cromosómica a la mitad. (SCOTT, 2005)

GRÁFICO 7: ESTRUCTURA DEL OVOCITO



Fuente: (TAPIA, 2014)

1.5.1.1.1. Zona pelúcida

La zona pelúcida (ZP) es una matriz extracelular, que rodea al ovocito y al embrión mamífero en estadios tempranos de desarrollo. Constituye una capa que separa el oolema de la región más interna del folículo. La ZP desempeña un rol de importancia en los mamíferos en los diferentes pasos del proceso de fecundación. (PALMA, 2001)

1.5.1.1.2. Membrana plasmática

La membrana plasmática o celular es una estructura laminar que engloba a las células, define sus límites y contribuye a mantener el equilibrio entre el interior (medio intracelular) y el exterior (medio extracelular) de éstas. Además, se asemeja a las membranas que delimitan los orgánulos de células eucariotas. (RIQUELME, 2010).

1.5.1.1.3. Pronúcleo ovular

Es el núcleo del ovocito y que contiene la mitad de la información genética del nuevo individuo. (RIQUELME, 2010)

1.5.1.1.4. Gránulos corticales

Gránulo vesicular, de un diámetro de 0,3 a 0,5 micras, que se encuentra bordeando toda la superficie interna del ovocito y que, tras la fecundación, se fusiona con la membrana plasmática, liberando un contenido que da lugar a lo que se llama reacción cortical, para formar la membrana de fecundación, evitando así la entrada de nuevos espermatozoides y, por tanto, la polispermia. (HAFEZ, B, 2002)

1.5.1.1.5. Espacio perivitelino

Espacio que queda entre el ovocito y la zona pelúcida que lo envuelve, de un grosor aproximado de entre 0,2 y 0,4 micras. (NAVARRA, 2015)

1.5.1.2. Clasificación de los Ovocitos

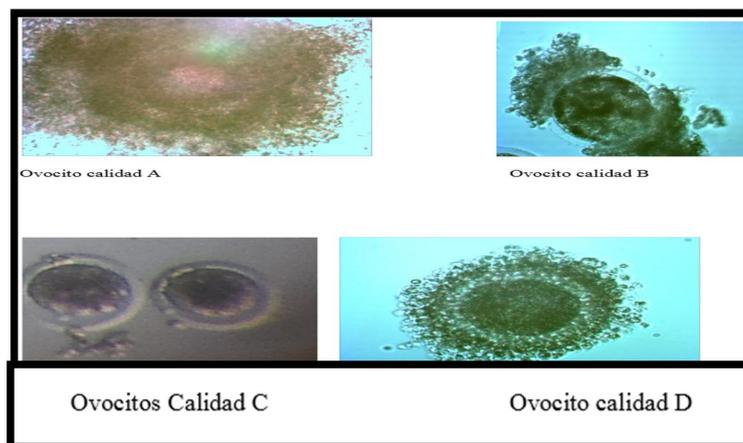
Tipo A corresponde a un ovocito con células del cumulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente;

Tipo B tiene capas múltiples del cúmulus (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras.

Tipo C se caracteriza por tener un cumulus desnudado y un citoplasma irregular con zonas oscuras.

El **Tipo D** tiene el cumulus con células expandidas y un citoplasma irregular y con zonas oscura. (MARTINEZ, 2013)

GRÁFICO 8: TIPOS DE OVOCITOS POR SU CALIDAD



Fuente: (MARTINEZ, 2013)

1.6. ESTADO MADURATIVO DE LOS OVOCITOS

La maduración de los ovocitos de mamífero incluye una etapa de crecimiento y otra de maduración nuclear y citoplasmática, ambas necesarias para la posterior fecundación y desarrollo embrionario normales. (ROMAR, 2001)

Estructuralmente el ovocito maduro mide entre 110-115 micras y está rodeado de una membrana llamada oolema. Esta membrana contiene el citoplasma del ovocito u ooplasma, donde se encuentran las organelas citoplasmáticas y el núcleo. Rodeando al conjunto ovocito-oolema está la llamada zona pelúcida, que es de naturaleza glicoproteica y tiene un grosor de 15-20 micras que disminuye tras de la fecundación. El conjunto ovocito-zona pelúcida mide aproximadamente 150 micras. Entre el oolema y la zona pelúcida está el espacio perivitelino, en el que se encuentra el corpúsculo polar. La presencia de un corpúsculo polar (CP) indica que la maduración nuclear ha finalizado. (BEHR B, 2004)

1.7. MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE OVOCITOS

1.7.1. Método de corte seriado

Los ovarios se transportaron al Laboratorio en solución salina suplementada con antibióticos. En el Laboratorio se hace remoción del tejido adyacente, del cuerpo lúteo y de sangre con lavados de solución salina. El método de corte seriado consiste en colocar cada uno de los ovarios en placas petri que contienen la solución, se corta la superficie y el interior de los ovarios a lo largo y a través de éste con cuchillas separadas por 2mm aproximadamente. (VELARDE, 2000).

1.7.2. Método de aspiración

Se someten a este procedimiento folículos superficiales visibles con jeringas de 5-10 cc y agujas calibre 18 G. (VELARDE, 2000)

1.8. CRIOPROTECTORES

Un crioprotector es una sustancia anticongelante que previene o reduce la formación de cristales de hielo. El uso de crioprotectores en criónica reduce el daño por congelación, o puede incluso eliminar por completo los cristales de hielo. (SANDOVAL, 2007).

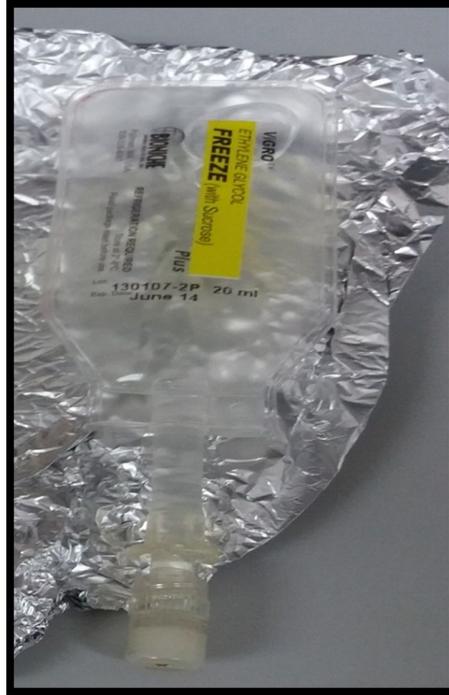
1.8.1. Crioprotectores Permeables

Los crioprotectorpermeables son sustancias que por su bajo peso molecular pueden atravesar la membrana plasmática, dónde tienen la función de evitar la formación intracelular de cristales de hielo, así como evitar la excesiva deshidratación causada por la congelación lenta. Entre los más utilizados está el glicerol y el etilenglicol, siendo el primero el que ha mostrado mejores resultados en estudios de criopreservación. (SANDOVAL, 2007)

1.8.1.1. Etilenglicol

La eficacia del etilenglicol como crioprotector ha sido ampliamente descrita y se han realizado diferentes estudios para tratar de determinar las concentraciones óptimas y los tiempos de exposición. El más utilizado en los procedimientos de vitrificación es el (EG), ya que tiene mayor permeabilidad y relativa baja toxicidad comparada con otros crioprotectores. (RAMIREZ, y otros, 2012)

GRÁFICO 9: ETILENGLICOL



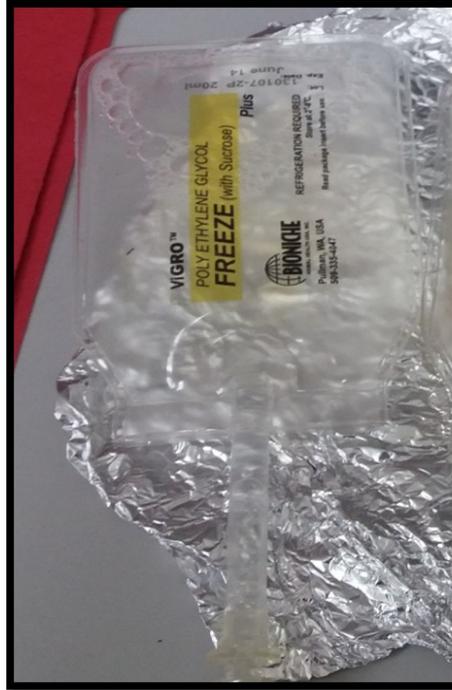
Fuente directa:

VILLAMARÍN, Kimberley 2015

1.8.1.2. *Propilenglicol*

El polietilenglicol (PEG) es un agente crioprotector no penetrante que a concentraciones molares reducidas confiere un efecto crioprotector usando velocidades lentas de congelación. Ejerce su acción disminuyendo no sólo la formación de hielo tisular, sino también favoreciendo la deshidratación celular, factor muy importante para la tolerancia a la congelación. Los malos resultados iniciales hicieron abandonar su uso, pero con modificaciones en su concentración, velocidad de enfriamiento y temperatura de almacenamiento se obtienen buenos resultados a nivel experimental, lo que supone una esperanza para su uso en humanos. (GUTIERREZ, y otros, 2000).

GRÁFICO 10: PROPILENGLICOL



Fuente directa:

VILLAMARÍN, Kimberley 2015

1.9. CONSERVACIÓN LENTA DE OVOCITOS

La congelación lenta es una técnica de crioconservación en la que existe un “equilibrio” entre la velocidad de enfriamiento, la velocidad de deshidratación y la velocidad de formación de núcleos de hielo. El objetivo principal de este tipo de crioconservación es de controlar la velocidad de enfriamiento de tal forma que a medida que descienda la temperatura se produzca la penetración del crioprotector al interior de la célula produciéndose un equilibrio osmótico y disminuyendo la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares. (MONTIEL, 2011)

1.10. ASPECTOS GENERALES DE LA TÉCNICA

Para prevenir la formación de hielo intracelular o minimizar el daño que este pueda causar, todos los protocolos de congelación están destinados a deshidratar las células. En el caso de los protocolos de congelación lenta, este proceso se consigue colocando a las células en una solución que contiene entre un 10 y un 11% (v/v) de crioprotector (aproximadamente 1.5 mililitro).

Cuanto más baja es la temperatura, más cantidad de agua puede convertirse en hielo, pero la capacidad de la célula para eliminar el agua intracelular también disminuye a medida que la temperatura disminuye. Por lo tanto, el éxito de un protocolo de congelación lenta se basa en alcanzar el equilibrio entre la velocidad a la que el agua abandona la célula y la velocidad con que esta agua se convierte en hielo. (ALBARRACÍN, 2005)

1.10.1. Nitrógeno Líquido

El nitrógeno líquido (N₂) es un gas licuado, ampliamente empleado en las tecnologías y biotecnologías reproductivas para la conservación de semen, ovocitos, embriones, sueros, enzimas, tejidos, células y productos químicos.

Su uso requiere, conocer bien sus propiedades y seguir las recomendaciones de seguridad para evitar los efectos negativos. (PALMA, Gustavo, 2007)

1.10.2. Osmolaridad

La osmolaridad es uno de los controles de calidad, imprescindibles en un laboratorio que produce sus propios medios, a fin de evitar los errores de pesado y dilución de sus componentes, como también para controlar la calidad del agua empleada y de los suplementos de los medios de cultivo. (PALMA, Gustavo, 2001)

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe sobre la ubicación geográfica en donde se realizó el estudio, los materiales y equipos utilizados para su desarrollo, los métodos y técnicas aplicadas.

2.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

2.1.1. Ubicación Política.

- **PROVINCIA:** Cotopaxi
- **CANTÓN:** Latacunga
- **PARROQUIA:** Eloy Alfaro
- **BARRIO:** Salache Bajo

2.1.2. Ubicación Geográfica

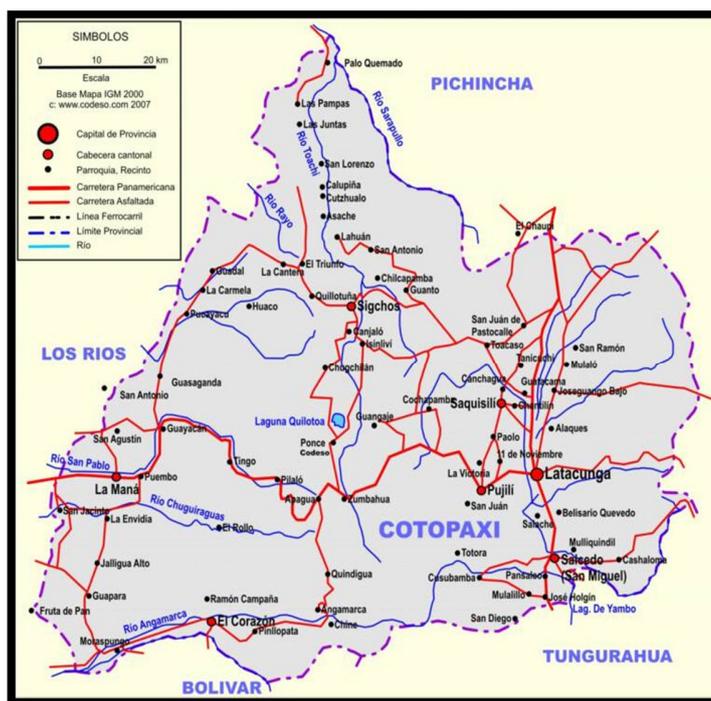
- **LATITUD:** 00°59'47.68"S.
- **LONGITUD:** 78°31'9.16"W.
- **ALTITUD:** 2757.591 m.s.n.m.

2.1.3. Datos Meteorológicos.

- **TEMPERATURA PROMEDIO:** 10.7°C
- **PLUVIOSIDAD:** 175 mm (anuales)
- **HORAS LUZ/DIA:** 12 horas
- **VIENTO:** sureste-noreste
- **NUBOSIDAD ANUAL:** 4.7/8.

Fuente: Registros administración CEYPSA/2007

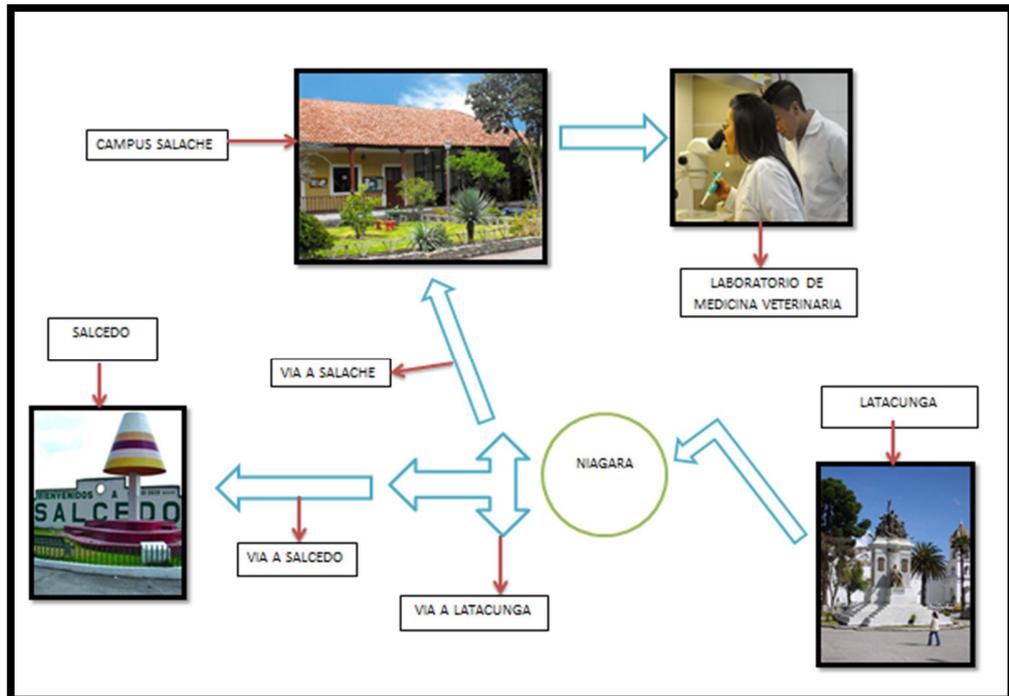
GRÁFICO 11: UBICACIÓN GEOGRÁFICA



Fuente:

(Gobierno Autónomo Descentralizado de la Ciudad de Latacunga, 2012)

GRÁFICO 12: CROQUIS DEL LUGAR



Fuente directa:

Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

2.2. RECURSOS MATERIALES.

Los materiales que se utilizaron fueron

2.2.1. Materiales de oficina

- Papel bond.
- Copias.
- Impresiones.
- Anillados.
- Empastados Libreta.
- Resma de hojas

2.2.2. Recursos tecnológicos

- Flash memory.
- Internet.
- Calculadora
- Cámara fotográfica.
- Computadora
- Impresora

2.2.3. Materiales de laboratorio

- Mandil
- Guantes.
- Cofia
- Mascarilla.
- Jeringuillas
- Bisturí.
- Estereomicroscopio (NIKON SMZ 745).
- Micropipetas
- Cajas Petri.
- Cloruro de sodio al 0.9%.
- Crioprotector etilenglicol (bioniche).
- Crioprotector polietilenglicol (bioniche)
- Solución Holding (minitub).
- Pajillas de 0.25
- Crioconservadora (Cryobath)
- Termo de nitrógeno líquido (SEMEX).
- Tapones de pajuelas de embriones.

2.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN.

2.3.1. Experimental

En la investigación experimental se presenta mediante la manipulación de variables experimental no comprobadas, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular; en este caso la interacción entre técnicas de obtención de los ovocitos y crioprotectores para la conservación lenta de ovocitos de cobayas.

2.3.2. Explicativa.

Su objetivo es realizar descripciones previas del problema en estudio y ayudar a un planteamiento del problema de investigación o seleccionar una metodología por medio de la cual quedará estandarizada una técnica.

En esta investigación se realizó una técnica diferente a la utilizada en la extracción de ovocitos de otras especies. utilizando el método de slicing ya que está entre las técnicas ideales para la extracción de los ovocitos de cuyes y además que es una técnica rápida que permite no comprometer las estructuras de los ovocitos de los cuyes.

2.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

La metodología que se utilizó es el método experimental donde se manipula una o más variables de estudio, para controlar el aumento o disminución de esas variables y su efecto en las conductas observadas. Dicho de otra forma, un experimento consiste en hacer un cambio en el valor de una variable (variable independiente) y observar su efecto en otra variable (variable dependiente). Esto se lleva a cabo en condiciones

rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular. (MURILLO, 2010)

Los métodos experimentales son los adecuados para poner a prueba hipótesis de relaciones causales es por ello que con esta metodología se realizó la manipulación de variables independientes en este caso la extracción de los ovocitos de las cobayas para su conservación lenta identificando cual sería el crioprotector (etilenglicol, polietilenglicol), ideal, para observar efectos en cuanto a su calidad pre y post congelación.

2.4.1. Métodos

Los métodos que se emplearon para desarrollar la presente investigación fueron: el método inductivo y el método deductivo

2.4.1.1. 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. (GARCIA, 2008).

En esta investigación el método deductivo permitió desarrollar una teoría de la investigación que inició una hipótesis básica y luego se dedujo los resultados del experimento de la teoría formal.

2.4.1.2. Método Inductivo

El método inductivo o inductivismo es aquel método científico que obtiene conclusiones generales a partir de premisas particulares. Se trata del método científico más usual, en el que pueden distinguirse cuatro pasos esenciales: la observación de los hechos para su registro; la clasificación y el estudio de estos hechos; la derivación inductiva que parte de los hechos y permite llegar a una generalización; y la contrastación. (GARCIA, 2008).

En esta investigación el método inductivo permitió obtener información a partir de la examinación de las variables (técnicas de obtención de ovocitos y crioprotectores) al intervenir en ellas y como estas producen cambios sobre las otras variables (cantidad y calidad pre y post congelación).

2.4.2. Técnicas

Consiste en examinar directamente algún hecho o fenómeno según se presenta pudiendo ser este fenómeno espontáneo o natural, teniendo un propósito expreso conforme a un plan determinado y recopilando los datos en una forma sistemática.

Por esto se aplicó este método para el estudio de la evaluación de dos crioprotectores (Etilenglicol y Propilenglicol) para la conservación lenta de ovocitos de cobayos hembra ya que es una biotecnología reproductiva que representa una mejora notable de los recursos cunicultores al permitir combinar diversos procesos y técnicas para la conservación de un alto potencial genético en cuyes.

2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El diseño experimental es una técnica estadística que permite identificar y cuantificar las causas de un efecto dentro de un estudio experimental. En un diseño experimental se manipulan deliberadamente una o más variables, vinculadas a las causas, para medir el efecto que tienen en otra variable de interés. El diseño experimental prescribe una serie de pautas relativas qué variables hay que manipular, de qué manera, cuántas veces hay que repetir el experimento y en qué orden para poder establecer con un grado de confianza predefinido la necesidad de una presunta relación de causa-efecto. (LAGRAÑA, 2013)

2.5.1. t DE STUDENT

La prueba de t Student, es un método de análisis estadístico, que compara las medias de dos grupos diferentes. Es una prueba paramétrica, o sea que solo sirve para comparar variables numéricas de distribución normal. La prueba t Student, arroja el valor del estadístico t. Según sea el valor de t, corresponderá un valor de significación estadística determinado. En definitiva la prueba de t Student contrasta la H0 de que la media de la variable numérica “y”, no tiene diferencias para cada grupo de la variable categórica “x”. (RODRIGUEZ, 2000).

FÓRMULA

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}}$$

Dónde.

X1 = Media de primer conjunto de valores

x2 = Media de segundo conjunto de valores

S1 = Desviación estándar del primer conjunto de valores

S2 = Desviación estándar del segundo conjunto de valores

n1 = número total de valores en la primera serie

n2 = número total de valores en la segunda serie. (CHITARRONI, 2003)

TABLA 3: DISTRIBUCIÓN DE TRATAMIENTOS

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
TRATAMIENTO (T1)	ETILENGLICOL
TRATAMIENTO (T2)	PROPILENGLICOL

Fuente directa:

Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

2.5.2. UNIDADES EXPERIMENTALES

Las unidades experimentales obtenidas fueron 420 ovocitos los mismo que fueron clasificados según su categoría en calidad A, B y C, posterior a esta clasificación se utilizaron solo los ovocitos de calidad A contando con un número de 226 ovocitos para su posterior crioconservación con los crioprotectores etilenglicol y propilenglicol.

2.6. MANEJO DEL ENSAYO

Se siguió el protocolo que se describe a continuación:

- Se seleccionó animales (grupo homogéneo).
- Se recolecto los ovarios de los animales previamente faenados.
- Una vez extraídos se colocó en un termo con agua bidestilada, con la finalidad de mantener intactas las estructuras.
- Una vez en el laboratorio se procedió a retirar las estructuras anexas de los ovarios que aún estén impregnadas como ligamentos, tejido adiposo, fascias.
- Posteriormente se realizó un lavado adicional de los ovarios con el objetivo de quitar las impurezas restantes.
- Se procedió aplicar la técnica de extracción de ovocitos, en este caso el método de slicing que consiste en realizar cortes transversales en el ovario para luego realizar los lavados retrógrados en el ovario.
- El líquido obtenido se colocó en una caja Petri con solución holding, la cual sirve de mantenimiento y lavado.
- Se evaluó la calidad de ovocitos, A, B, C evidenciando estructuras bajo el estereomicroscopio.
- Lavados y clasificados los ovocitos, al total de ovocitos de calidad A se les dividió para cada crioprotector expuestos durante 5 minutos para proceder al llenado de la pajilla y previa crioconservación.
- La crioconservación se la llevo a cabo en la CRYOBATER escogiendo una curva 3 que se denomina lenta.
- A la semana se evaluó post crioconservación, se evaluó el parámetro de calidad (A, B, C).

a) Método de slicing.

Se procedió a realizar un corte transversal en el ovario con la ayuda de un bisturí número 15. Se hicieron lavados retrógrados del ovario seccionado con solución holding y el contenido con el líquido folicular se depositó en una caja Petri para su subsiguiente evaluación.

b) Evaluación de la cantidad, calidad y madurez de ovocitos.

1. Primeramente se llevo al estereomicroscopio donde se realizó la selección de los ovocitos garantizando un óptimo resultado categorizándolos de la siguiente manera: TIPO: A, B y C tomando en cuenta las siguientes características:

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

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

2. Una vez encontrados los ovocitos de tipo A (inmaduros) se procedió a lavar en diversas gotas de holding colocadas en una caja petri diferente hasta que estén completamente limpios.
3. En una caja petri se colocó 3 o 4 gotas grandes de etilenglicol y en otra caja Petri de propilenglicol se procedió con el llenado de la pajilla de 0.25 en el extremo del algodón.
4. En el proceso de llenado se absorbió un segmento de etilenglicol, se dejó un espacio de aire, se absorbió los ovocitos, se dejó un espacio de aire y otro segmento de etilenglicol para posteriormente sellar la pajilla con un tapón de embriones.

5. En el proceso de llenado se absorbió un segmento de propilenglicol, se dejó un espacio de aire, se absorbió los ovocitos, se dejó un espacio de aire y otro segmento de propilenglicol para posteriormente sellar la pajilla con un tapón de embriones, pvc o bolitas.
6. Luego se encendió la criocervadora, se llenó de nitrógeno líquido se ubicó en la curva 3 de congelación lenta la misma que se marcó -6 que es la temperatura óptima para colocar las pajillas previamente llenas y se esperó 5 minutos y empieza la curva alrededor de 1 a 2 horas.
7. Luego se realizó el empaquetado que consistió en introducir ovocitos en la pajilla con la misma técnica para embriones, es decir, suspendidos en un medio de congelación separado por 2 burbujas de aire en ambos extremos de la pajilla.
8. Después de este transcurso de tiempo se puede sacar las pajillas desde -23°C a -33°C para luego ser colocada en un termo de nitrógeno líquido.

c) Post Descongelación

Se Descongeló las pajillas luego de 2 semanas se evaluó con la ayuda del estereomicroscopio si la calidad continuó o se degradó. El protocolo que se siguió para llevar a cabo la descongelación fue la siguiente:

1. Se abrió el termo de nitrógeno líquido donde se encuentran las pajuelas.
2. Se sacó con cuidado la canastilla sin sobrepasar la boca del termo de nitrógeno líquido.
3. Rápidamente con una pinza se extrajo la pajuela.
4. Se descongeló en agua a 37°C durante 45 segundos.
5. Se cortó el extremo de la pajuela donde se encuentra el tapón.
6. Se sacudió con movimientos leves.
7. Se coló el material en una caja Petri.
8. Se observó al estereomicroscopio para verificar la calidad y la viabilidad de los ovocitos descongelados.

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente capítulo se detallan los resultados obtenidos en el proceso de experimentación, los análisis estadísticos y las representaciones gráficas de las variables: técnicas de obtención de ovocitos, crioprotectores, número de ovocitos y calidad de ovocitos pre y post crioconservación.

3.1. Numero De Ovocitos Recolectados

TABLA 4: OVOCITOS RECOLECTADOS Y CATEGORIZADOS

		TIPO A	TIPO B	TIPO C
TOTAL	420	226	97	97
PORCENTAJE	100%	53.8%	23%	23%

Fuente directa:
Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

3.2. Calidad de los Ovocitos Pre Congelación.

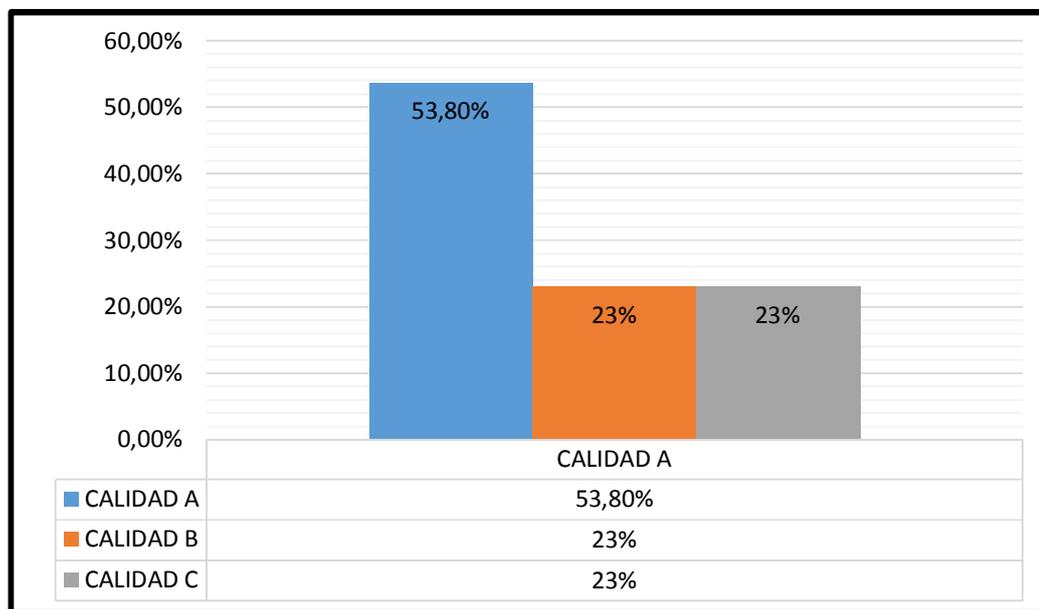
TABLA 5: CALIDAD DE OVOCITOS PRE CONGELACIÓN.

ORD.	OVARIO	CANTIDAD # OVOCITOS	CALIDAD			C16	D	4	2	1	1
			A	B	C						
C1	D	8	5	2	1	C17	I	5	3	1	1
	I	6	3	2	1		D	6	4	2	0
C2	D	7	4	1	2	C18	I	7	4	2	1
	I	5	3	1	1		D	7	5	1	1
C3	D	8	5	3	0	C19	I	8	4	1	3
	I	9	5	2	2		D	5	3	1	1
C4	D	6	2	3	1	C20	I	8	5	1	2
	I	9	6	1	2		D	7	4	1	2
C5	D	7	4	2	1	C21	I	6	6	0	0
	I	7	2	3	2		D	7	3	2	2
C6	D	8	5	1	2	C22	I	6	4	0	2
	I	7	3	1	3		D	7	2	3	2
C7	D	8	6	0	2	C23	I	7	4	1	2
	I	6	3	1	2		D	8	3	4	1
C8	D	7	2	5	0	C24	I	7	4	2	1
	I	6	5	0	1		D	6	4	1	1
C9	D	7	3	2	2	C25	I	9	4	2	3
	I	8	5	1	2		D	7	3	1	3
C10	D	11	6	2	3	C26	I	7	2	3	2
	I	7	3	1	3		D	8	5	2	1
C11	D	8	4	1	3	C27	I	8	4	2	2
	I	9	5	2	2		D	7	4	2	1
C12	D	5	2	1	2	C28	I	6	3	1	2
	I	7	4	1	2		D	5	2	3	0
C13	D	6	5	1	0	C29	I	7	4	2	1
	I	9	4	2	3		D	6	2	2	2
C14	D	8	5	1	2	C30	I	8	4	3	1
	I	6	3	2	1		D	6	2	1	3
C15	D	7	5	1	1	TOTAL	I	8	4	2	2
	I	5	2	1	2	%		420	226	97	97
								100%	53.8%	23%	23%

Fuente directa:

Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

GRÁFICO 13: CALIDAD DE OVOCITOS PRE CONGELACIÓN.



Fuente directa:
Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

En cuanto al número de ovocitos extraídos se obtuvo un total de 420 ovocitos que representa el 100%, de los cuales se determinó el parámetro calidad, el mismo que en calidad A se observó 226 ovocitos, que representa el 53.8%; el calidad B y C se extrajo 23% es decir 97 ovocitos Tabla N° 5 y Gráfico N° 13.

En el desarrollo de la tesis realizada por parte de la Srta. Naranjo, Diana ella obtuvo 41 ovocitos que representa un 62,12% de calidad A, 7 ovocitos que representa el 10,61% de calidad B y 18 ovocitos que representa el 27,27% de calidad C. donde se puede manifestar que en el desarrollo de esta investigación se obtuvo mejores resultados en la obtención de ovocitos de cobayos previo a la crioconservación.

3.3. Madurez de los Ovocitos Pre Congelación.

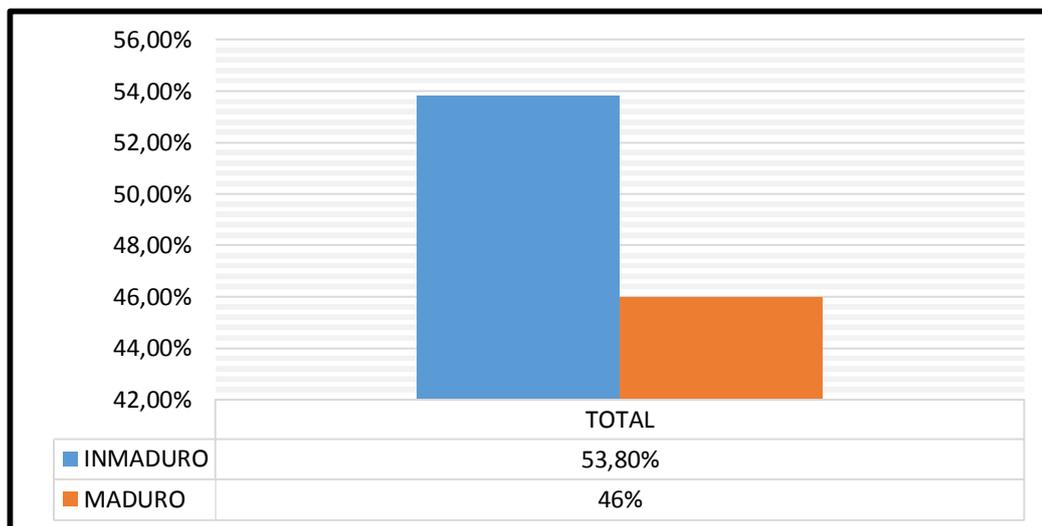
TABLA 6: MADUREZ DE LOS OVOCITOS PRE CONGELACIÓN.

ORDEN	# OVOCITOS	MADUREZ	
		INMADURO	MADURO
C1	14	8	9
C2	12	7	5
C3	17	10	7
C4	15	8	7
C5	14	6	8
C6	15	8	7
C7	14	9	5
C8	13	7	6
C9	15	8	7
C10	18	9	9
C11	17	9	8
C12	12	6	6
C13	15	9	6
C14	14	8	6
C15	12	7	5
C16	9	5	4
C17	13	8	5
C18	15	9	6
C19	13	8	5
C20	13	10	3
C21	13	7	6
C22	14	6	8
C23	15	7	8
C24	15	8	7
C25	14	5	9
C26	16	9	7
C27	13	7	6
C28	12	6	6
C29	14	6	8
C30	14	6	8
TOTAL	420	226	194
PORCENTAJE		53,80%	43%

Fuente directa:

Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

GRÁFICO 14: MADUREZ DE LOS OVOCITOS PRE CONGELACIÓN.



Fuente directa:
Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

En lo que se refiere al parámetro calidad, se utilizaron los ovocitos de Calidad A, que cumplen con los parámetros de calidad y son inmaduros con un total de 53.8% lo que equivale a 226 ovocitos, y en calidad maduros los ovocitos de calidad B y C con un total de 194 lo que equivale el 43% de un total de 420 ovocitos. Tabla N° 6 y Gráfico N° 14.

En el desarrollo de la tesis realizada por parte de la Srta. Naranjo, Diana donde determino que 41 ovocitos de tipo A son inmaduros los mismos que representan el 62.12% mientras que 25 ovocitos de tipo B y C son maduros y representan el 37.87%. identificando que en esta investigación se utilizaron un mayor número de ovocitos inmaduros siendo un total de 226 ovocitos que represental el 53.8%.

3.4. Calidad de los Ovocitos Post Descongelación.

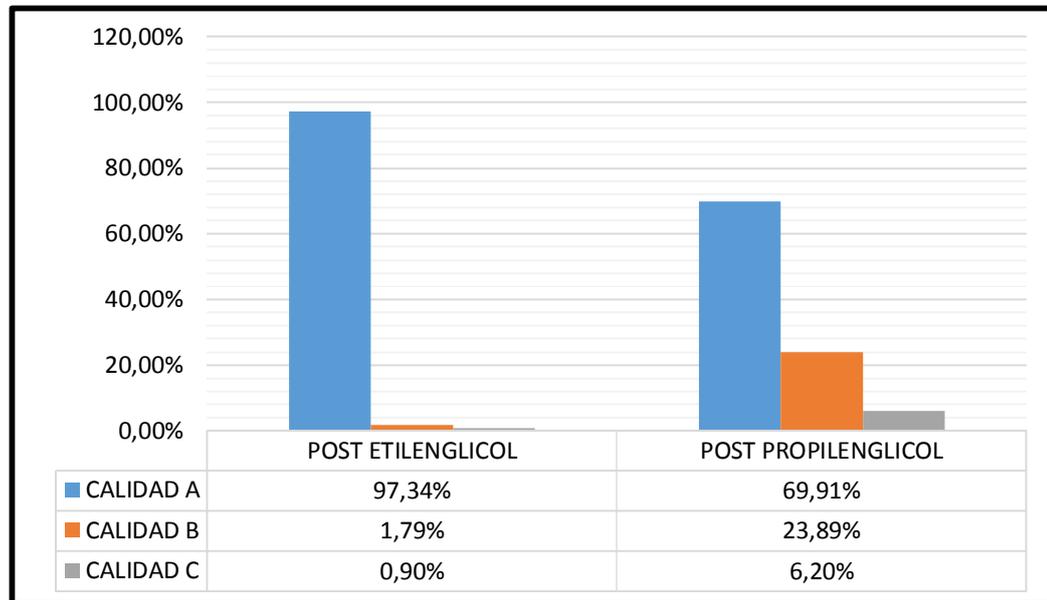
TABLA 7: CALIDAD DE LOS OVOCITOS POST DESCONGELACIÓN.

ORDEN	# DE OVOCITOS INMADUROS	POST ETILENGLICOL			POST PROPILENGLICOL		
		A	B	C	A	B	C
C1	8	4			3	1	
C2	7	3			3		1
C3	10	3	1	1	3	2	
C4	8	4			3	1	
C5	6	3			2	1	
C6	8	4			3	1	
C7	9	5			3	1	
C8	7	3			3	1	
C9	8	4			3	1	
C10	9	4	1		3	1	
C11	9	4			4	1	
C12	6	3			2	1	
C13	9	4			3	1	1
C14	8	4			3	1	
C15	7	4			2	1	
C16	5	2			1	1	1
C17	8	4			3	1	
C18	9	5			3	1	
C19	8	4			3	1	
C20	10	5			3	1	1
C21	7	4			2	1	
C22	6	3			3		
C23	7	3			3	1	
C24	8	4			2		2
C25	5	3			1		1
C26	9	5			3	1	
C27	7	3			3	1	
C28	6	3			2	1	
C29	6	3			2	1	
C30	6	3			2	1	
TOTAL	226	110	2	1	79	27	7
PORCENTAJE		97.34	1.76	0.9	69.91	23.89	6.2

Fuente directa:

Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

GRÁFICO 15: CALIDAD DE LOS OVOCITOS POST DESCONGELACIÓN.



Fuente directa:
Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

En cuanto al parámetro de calidad post crio conservación, se identificó que etilenglicol en el parámetro de calidad A es superior con 110 que representa el 97.34% de un total 113 que es el 100%, seguido de propilenglicol con 79 ovocitos de calidad A lo que representa el 69.91%, mostrando más pérdidas de ovocitos al descongelamiento. Tabla N° 7 y Gráfico N° 15

En el desarrollo de la tesis realizada por parte de la Srta. Naranjo, Diana donde determino que los ovocitos tanto crioconservados como post descongelados demostró que 41 ovocitos de tipo A son crioconservados y al momento de la descongelación se mantuvieron en buena calidad.

3.5. Evaluación de los dos Crio protectores.

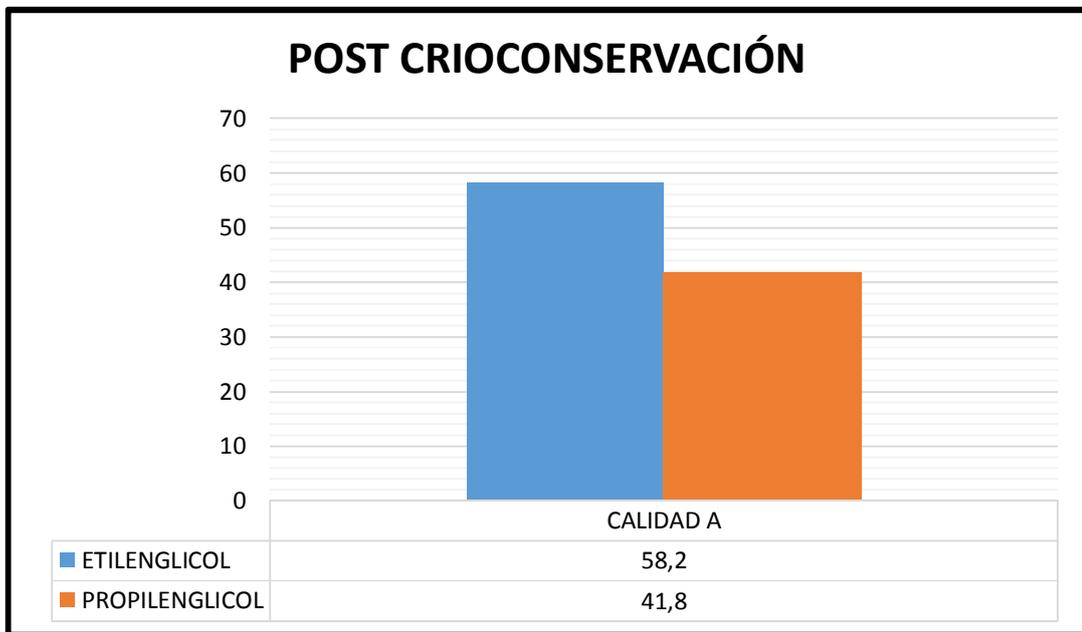
TABLA 8: EVALUACIÓN DE LOS DOS CRIOPROTECTORES.

ORDEN	# DE OVOCITOS INMADUROS	POST ETILENGLICOL	POST PROPILENGLICOL
		A	A
C1	8	4	3
C2	7	3	3
C3	10	3	3
C4	8	4	3
C5	6	3	2
C6	8	4	3
C7	9	5	3
C8	7	3	3
C9	8	4	3
C10	9	4	3
C11	9	4	4
C12	6	3	2
C13	9	4	3
C14	8	4	3
C15	7	4	2
C16	5	2	1
C17	8	4	3
C18	9	5	3
C19	8	4	3
C20	10	5	3
C21	7	4	2
C22	6	3	3
C23	7	3	3
C24	8	4	2
C25	5	3	1
C26	9	5	3
C27	7	3	3
C28	6	3	2
C29	6	3	2
C30	6	3	2
TOTAL	189	110	79
PORCENTAJE		58,2	41,8

Fuente directa:

Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

GRÁFICO 16: EVALUACIÓN DE LOS DOS CRIOPROTECTORES.



Se evidencia que de un total de 189 ovocitos de calidad A post-crioconervados se encuentran 110 ovocitos con el medio etilenglicol, que representan 58,2%. Y en propilenglicol con 79 ovocitos de calidad A lo que representa el 41,8% Según (Grafico 16)

3.6. Interpretación Tabla t de Student

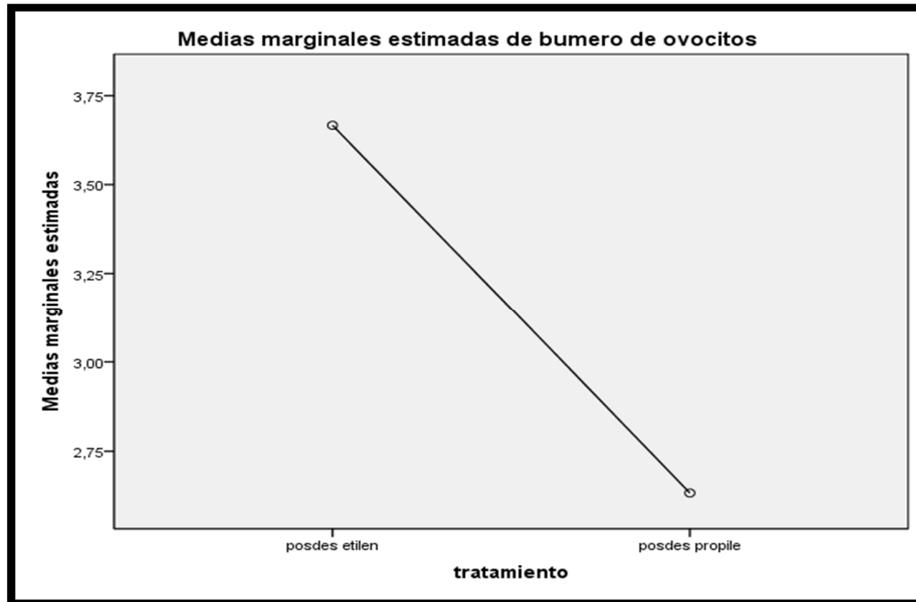
**TABLA 9: T STUDENT DE LA CALIDAD DE OVOCITOS
POSCRIOCONSERVACION.**

PRUEBA DE MUESTRAS INDEPENDIENTES		Prueba T para la igualdad de medias				
		t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
Número de ovocitos	Varianzas iguales	5,59 9	58	,000	1,03333	,18456

Elaborado por: FERNÁNDEZ, Ramiro 2016

En cuanto a la comparación de las variables se encontró que el valor es de $p=0.00 <$ que 0.025 se acepta la hipótesis alternativa, por tanto existe diferencia estadística en la calidad de los ovocitos post- crioconservación, siendo el mejor etilenglicol. Tabla N° 9.

**GRÁFICO 17: DE LA DIFERENCIA DE t STUDENT
POSCRIOCONSERVACION.**



Elaborado por: FERNÁNDEZ, Ramiro 2016

Al nivel del 5% existe evidencia para afirmar que existe diferencia entre los dos crioprotectores en la crio conservación de ovocitos de cobayos hembra como se observa en el gráfico es más eficiente el crioprotector etilenglicol. Grafico N°17.

CONCLUSIONES

- En esta investigación se logró determinar la evaluación de dos crioprotectores etilenglicol y propilenglicol en la conservación lenta de ovocitos de cuyes teniendo en cuenta que es la primera investigación realizada en esta área donde el etilenglicol es el crioprotector ideal para la crioconservación de ovocitos de cobayos con excelentes resultados.
- La presente investigación demostró que el crio protector ideal para la conservación lenta de ovocitos de cuyes es el Etilenglicol ya que al momento de la descongelación presento un mayor número de ovocitos de calidad A con 110 ovocitos, en comparación con el crio protector Propilenglicol con 79 ovocitos ya que presento mayor pérdidas en la descongelación de los ovocitos de cuyes.
- Mediante esta investigación se pudo determinar que el método de slicing está entre las técnicas ideales para la extracción de los ovocitos de cuyes, además que es una técnica rápida y que permite no comprometer las estructuras de los ovocitos.
- Los resultados de esta investigación permite datacar la importancia de crioconservar material genético de esta especie a fin de favorecer tanto a productores, técnicos y sobre todo a estudiantes que realizan este tipo de investigaciones.
- En cuanto al número de ovocitos extraídos se obtuvo un total de 420 ovocitos que representa el 100%, de los cuales se determinó el parámetro calidad, el mismo que en calidad A se observó 226 ovocitos, que representa el 53.8%; el calidad B y C se extrajo 23% es decir 97 ovocitos.

RECOMENDACIONES

- Es importante que los estudiantes sigan realizando este tipo de investigaciones reproductivas a fin de esta especie ya que es una buen alternativa para poder demostrar el verdadero potencial reproductivo para obtener germoplasma de esta especie.
- Se recomienda al momento de extraer los ovocitos de las cobayas utilizar recipientes estériles con agua bidestilada para el mantenimiento fresco de los ovarios y evitar que se produzca daños a nivel de las estructuras ováricas.
- Es necesario recalcar que para todo trabajo de este tipo se debe seguir todas las normar de bioseguridad y seguir minuciosamente el método a emplear ya que si algo llegara a fallar la investigación no reflejaría resultados verdaderos.
- Esta investigación mediante la crioconservación de germoplasma, principalmente ovocitos mediante la congelación hizo posible el establecimiento de bancos de material genético que permiten preservar la especie.

BIBLIOGRAFÍA

- **ALBARRACÍN, Jose. 2005.** Vitricación de Ovocitos Bovinos. Bellatera : s.n., 2005. Vol. II.
- **ÁLVAREZ, Armando, PEREZ Héctor. 2009.** *Fisiología animal aplicada*. Antioquia : s.n., 2009. 9587142195.
- **ARANIBAR, Eduardo. 2014.** Numero de ovulaciones por ciclo estrual en cuyes Andina y Peru. LIMA - PERU : s.n., 2014. Vol. 25. 1609-9117.
- **ARGOS, PV. 2014.** [En línea] 2014. [Citado el: 3 de MAYO de 2015.] <http://argos.portalveterinaria.com/noticias/1409/Articulos-archivo/Sistema-agrario-para-cuyes-cavia-porcellus.html>..
- **BEDÓN, Diego. 2011.** Gametogenesis. [En línea] 25 de 07 de 2011. [Citado el: 16 de 06 de 2015.] <http://es.slideshare.net/dediego/embriologa-uph-teora02>.
- **BEHR B, Wang H. 2004.** [En línea] 2004. [Citado el: 10 de Mayo de 2015.] <http://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/recomendaciones/clasificacion.pdf> . 115S:S72-S76.
- **BUSTAMANTE, Paola. 2014.** *Crianza de Cuyes*. Lima : FONCODES, 2014. pág. 5. ISBN, 2014-12117.
- **CADENA, Sixto. 2000.** *Crianza Casera y Comercial Cuyes*. Quito : Cadena de Editores, 2000.
- **CAMPESINOS, Fundacion Hogares Juveniles. 2013.** *Conejos y Cuyes*. Colombia : Grania Ltda, 2013. 978-958-8595-15-3.

- **CAMPESINOS, Fundacion hogares. 2002.** *Manual Agropecuario*. Bogota : s.n., 2002. 958-9321-33x.
- **CARAVACA, Rodriguez. 2005.** *Bases de la Produccion Animal*. Sevilla : s.n., 2005. 8447207641.
- **CARDENAS, Daniel. 2011.** ENGRADE. [En línea] 2011. [Citado el: 16 de 06 de 2015.] <https://www.engrade.com/danielcardenas/lessons>.
- **CASTAÑEDA, Leonardo. 2009.** Fisiologia de la Reproducción Bovina. [En línea] 2009. [Citado el: 10 de 06 de 2015.] <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/5640/T14.09%20C275f.pdf?sequence=1>.
- **CHITARRONI, Horacio. 2003.** Prueba t de Student para Diferencia de Medias y Proporciones. [En línea] 2003. [Citado el: 18 de 06 de 2015.] <http://metodos-avanzados.sociales.uba.ar/files/2014/04/La-prueba-de-T.pdf>.
- **ESIMER. 2011.** [En línea] 2011. [Citado el: 3 de MAYO de 2015.] <http://www.esimer.com/ovogenesis-espermatogenesis.php>. 20308022.
- **ESPINOZA, Jose, y otros. 2007.** Crecimiento Folicular Ovarico en Animales Domesticos. CARACAS : s.n., 2007. Vol. 32. 0378-1844.
- **GARCIA, Colbert. 2008.** Método Deductivo y Método Inductivo. [En línea] MAESTRIA EN TECNOLOGIA DE LA CONSTRUCCION, 15 de 04 de 2008. [Citado el: 19 de 06 de 2015.] <http://colbertgarcia.blogspot.com/2008/04/metodo-deductivo-y-metodo-inductivo.html>.
- **GIGLI, I, Russo, A. y Agüero, A. 2006.** Consideraciones sobre la Dinámica Ovárica en Equino, Bovino y Camélidos Sudamericanos. Argentina : s.n., 2006. Vol. 8. 1668-3498.

- **Gobierno Autonomo Descentralizado de la Ciudad de Latacunga. 2012.** *Plan del Buen Vivir y Ordenamiento Territorial.* Latacunga : s.n., 2012.
- **GREGOIRE, Anne. 2010.** Crioconservacion de dos Recursos Geneticos del Cuy (*Cavia Porcellu*) Produccion y Congelacion de Embriones. LIMA : INTERNACIONAL, 2010. Vol. 39. 0303-7495.
- **GUTIERREZ, Carretero Encarnacion, y otros. 2000.** Criopreservación cardíaca a temperatura subcero: estudio de la función sistólica y diastólica. 2000. Vol. 53, 09.
- **HAFEZ, B. 2000.** *Reproduccion e Inseminacion Artificial en Animales.* s.l. : Mexicana, 2000. 0683-30577-8.
- **HAFEZ, B. 2002.** *Reproducción e Inseminación Artificial en animales.* Mexico : McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V., 2002. pág. 13. ISBN, 970-10-3719-7.
- **HAFEZ, B. 2002.** *Reproducción e Inseminación Artificial en animales.* Mexico : McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V., 2002. págs. 92, 542, 545-547. ISBN, 970-10-3719-7.
- **HORST, Erich König, HANS-Georg Liebich. 2005.** *Anatomía de los Animales Domésticos.* s.l. : Panamericana, 2005. 8479037474.
- **JIMENEZ, Adriana. 2005.** [En línea] 2005. [Citado el: 6 de Mayo de 2015.] <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1761/1/17T0791.pdf>.
- **LAGRAÑA, Claudia. 2013.** Diseño Experimental Estadístico. [En línea] Universidad del Salvador, 13 de 03 de 2013. [Citado el: 19 de 06 de 2015.] <http://www.usal.edu.ar/archivos/virasoro/docs/Dise%F1o%20Experimental%20Estad%EDstico.pdf>.

- **LÓPEZ, Rafael. 2010.** Aparato Reproductor de la Hembra. [En línea] 2010. [Citado el: 01 de 06 de 2015.] <http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/AFA/TEORICOS/14%20-%20Aparato%20reproductor%20hembra.pdf>.
- **LOPEZ, Sixto. 2000.** *Crianza Casera y Comercial de Cuyes*. Quito : Cadena de Editores, 2000.
- **LOPEZ, Yuston. 2012.** SLIDESHARE. *slideshare*. [En línea] slideshare, 15 de 07 de 2012. [Citado el: 06 de 05 de 2015.] <http://es.slideshare.net/sextobtres/informe-del-cuy-zoologia>.
- **MAMANI, Mario. 2013.** Crianza de Cuyes. [En línea] CENTRO DE INVESTIGACION BIOLOGICA, 06 de 04 de 2013. [Citado el: 14 de 06 de 2015.] <http://es.slideshare.net/mariojuanmamanicalsina/4t-m-crianzacuyes>.
- **MARTINEZ, Yaiza. 2013.** [En línea] Junio de 2013. [Citado el: 9 de Mayo de 2015.] <http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17398/1/TFM%20Yaiza%20Martinez.pdf>.
- **MELLISHO, E. 2010.** [En línea] 2010. [Citado el: 10 de Mayo de 2015.] http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/Reproduccion_archivos/Practica%20-eval-ovocitos.pdf.
- **MONTIEL, Felipe. 2011.** Efecto del Método de Criopreservación sobre el Desarrollo de Blastocitos Bovinos. [En línea] 08 de 2011. [Citado el: 16 de 06 de 2015.] <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/30460/4/GulMagana.pdf>.
- **MURILLO, Javier. 2010.** Métodos de Investigación de Enfoque Experimental. 24 de 11 de 2010.
- **NAVARRA. 2015.** [En línea] 2015. [Citado el: 9 de Mayo de 2015.] <http://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/espacio-perivitelino>.

- **OÑATE, Cristina. 2008.** [En línea] 2008. [Citado el: 9 de Mayo de 2015.] <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/1612/1/17T0835.pdf>.
- **ORIBE, PERCY. 2004.** [En línea] 2004. [Citado el: 3 de MAYO de 2015.] <http://www.monografias.com/trabajos76/cuyes-cuy/cuye-cuy2.shtml>.
- **ORTIZ, Sebash. 2013.** Buenas Tareas . [En línea] 13 de JUNIO de 2013. [Citado el: 3 de MAYO de 2015.] <http://www.buenastareas.com/ensayos/Aparato-Reproductor-Del-Cuy/30469094.html>.
- **PAJARES, Cecilia. 2009.** [En línea] 2009. [Citado el: 3 de MAYO de 2015.] http://veterinaria.unmsn.edu.pe/files/pajares_cuyes.pdf.
- **PAJARES, CECILIA. 2009.** [En línea] 2009. [Citado el: 3 de MAYO de 2015.] http://veterinaria.unmsn.edu.pe/files/pajares_cuy.pdf.
- **PALMA, Gustavo. 2001.** *Biotecnología de la reproducción*. 2001. ISBN 9874337796.
- **PALMA, Gustavo. 2007.** Nitrogeno Liquido. [En línea] 2007. [Citado el: 4 de Mayo de 2015.] http://www.reprobiotec.com/nitrogeno_liquido_uso.html.
- **PEREZ, M, CERBON, M y CAMACHO, I. 2001.** Actividad Secretora del Oviducto de Mamíferos Domésticos durante la Fertilización y el Desarrollo Embrionario temprano. s.l. : CIE NCIA VETERINARIA, 2001. pág. 230. 9-2003-4.
- **PEREZ, Margarita. 2004.** *Manual de crianza de animales*. s.l. : LEXUS EDITORES, 2004. pág. 432. ISBN, 9972-625-74-5.
- **RAMIREZ y ORLANDO & BERNAL, SANDRA. 2012.** Vitrificación de embriones bovinos productivos in vitro. BOGOTA : PRINT VERSION, 2012. Vol. 15. 0123-4226.

- **RIQUELME, Pamela. 2010.** [En línea] 4 de Mayo de 2010. [Citado el: 10 de Mayo de 2015.] <http://grupodebiologiaa.blogspot.com/2010/05/funciones-del-ovulo-y-espermatozoide.html>.
- **RODRIGUEZ, Raul. 2000.** Tutorial Básico de Estadística. [En línea] MEDAL PROJECT, 08 de 2000. [Citado el: 20 de 06 de 2015.] <http://www.infor.uva.es/~isaac/doctorado/stadhelp2k.pdf>.
- **ROMAR, Raquel. 2001.** [En línea] Noviembre de 2001. [Citado el: 10 de Mayo de 2015.] <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/145/1/RomarAndres.pdf>.
- **SANDOVAL, Rocío Y otros. 2007.** [En línea] 2007. [Citado el: 10 de Mayo de 2015.] http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172007000200004&script=sci_arttext.1609-9117.
- **SCOTT, Gilbert. 2005.** *Biología del desarrollo*. s.l. : Panamericana, 2005. 9789500608695.
- **SOSA, Alberto. 2002.** *Manual Agropecuario*. Bogota-Colombia : s.n., 2002. 958-9321-35-6.
- **TAPIA, Sergio. 2014.** BIOLOGIA . [En línea] 23 de 02 de 2014. [Citado el: 16 de 06 de 2015.] <http://biosextosecundaria.blogspot.com/2014/02/el-aparato-reproductor-femenino-es-el.html>.
- **VELARDE, Nicolás. 2000.** [En línea] 2000. [Citado el: 10 de Mayo de 2015.] http://www.unjbg.edu.pe/coin2/pdf/c&d_9_art_28.pdf.

ANEXOS

Tablas de toma de datos de acuerdo a las variables a investigar.

ANEXO 1. NÚMEROS DE OVOCITOS RECOLECTADOS

<u>NÚMEROS DE OVOCITOS RECOLECTADOS</u>			
<u>OVARIO</u>			
<u>ORDEN</u>	<u>IZQ.-DER.</u>	<u>CANTIDAD</u>	<u>CARACTERÍSTICAS</u>

Fuente Directa:

Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

ANEXO 2. CANTIDAD DE OVOCITOS INMADUROS

<u>CANTIDAD DE OVOCITOS INMADUROS</u>			
<u>PRACTICA N°</u>			
<u>#/OVOCITOS</u>	<u>CLASIFICACIÓN</u>	<u>CALIDAD</u>	<u>CARACTERÍSTICAS</u>

Fuente Directa:

Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

ANEXO 3. COLECCIÓN DE OVOCITOS SEGÚN SU CALIDAD

COLECCIÓN DE OVOCITOS SEGÚN SU CALIDAD				
<u>OVARIO</u>				
<u>ORDEN</u>	<u>IZO.-DER.</u>	<u>TIPO A</u>	<u>TIPO B</u>	<u>TIPO C</u>

Fuente Directa:

Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

ANEXO 4. CALIDAD DE OVOCITOS POST DESCONGELADO

COLECCIÓN DE OVOCITOS SEGÚN SU CALIDAD				
<u>OVARIO</u>				
<u>OVARIOS</u>	<u>Nº OVOCITOS</u>	<u>TIPO A</u>	<u>TIPO B</u>	<u>TIPO C</u>
PAJILLA 1				
PAJILLA 2				
PAJILLA 3				

Fuente Directa:

Elaborado por: VILLAMARÍN, Kimberley 2015

ANEXO 5. IMÁGENES DE LAS PRÁCTICAS

FOTO 1. MATERIALES



FOTO 2. CRIOCONSERVADORA



FOTO 3. CRIOPROTECTORES

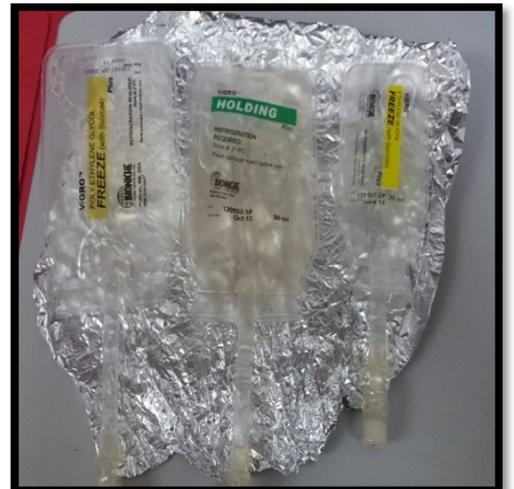


FOTO 4. COBAYAS HEMBRAS



FOTO 5. APARATO REPRODUCTOR FEMENINO



FOTO 6. IDENTIFICACION DE LOS OVOCITOS



FOTO 7. MÉTODO DE SLICING.

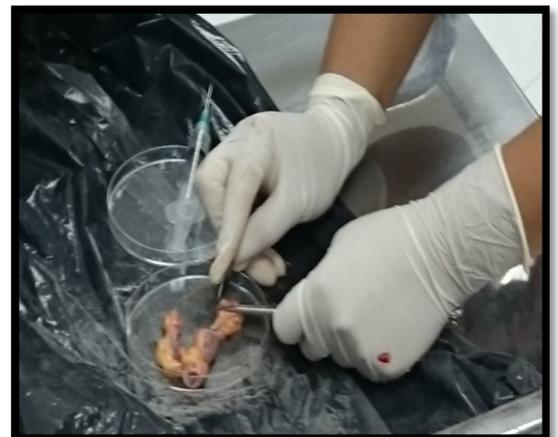


FOTO 8. LAVADOS RETRÓGRADOS DE EL OVARIO.



FOTO 9. APLICACIÓN DE SOLUCIÓN HOLDING.



FOTO 10. EVALUACION DE LOS OVOCITOS A, B, C.



FOTO 11. SELECCIÓN DE LOS OVOCITOS DE CALIDAD A.

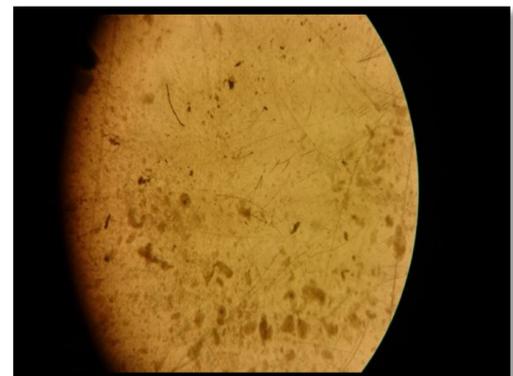


FOTO 12. LAVADO DE LOS OVOCITOS.



FOTO 13. LLENADO DE LA PAJILLA.



FOTO 14. ENCENDER EL CRYOBATER EN UNA CURVA #3.



FOTO 15. COLOCACIÓN DE LAS PAJILLAS.



**FOTO 16. TRASLADO DE LAS PAJILLAS
A UN TERMO CON NITROGENO L.**



POST-DESCONGELACIÓN

FOTO 17. SACADO DE LAS PAJILLAS



FOTO 18. DESCONGELADO DE LA PAJILLA



**FOTO 19. EVALUACION POST
DESCONGELACION**



FOTO 20. VISITA DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

