



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CIANOCOBALAMINA SOBRE EL DESARROLLO DE OVOCITOS RECUPERADOS DE OVARIOS BOVINOS POST MORTEM DE CENTROS DE FAENAMIENTO, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”

Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de Médico Veterinario y Zootecnista

Autor:

Vannessa Belén Andrade Males

Tutor:

MSc. Fabián Manuel Guerrero Paredes

Latacunga – Ecuador

Febrero 2020

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, **VANNESSA BELÉN ANDRADE MALES** con C.C 1723622559 declaro ser autora del presente proyecto de investigación: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CIANOCOBALAMINA SOBRE EL DESARROLLO DE OVOCITOS RECUPERADOS DE OVARIOS BOVINOS POST MORTEM DE CENTROS DE FAENAMIENTO, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.”**, siendo el MSc. Fabián Manuel Guerrero Paredes director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Tutor

Autor



MSc. Fabián Manuel Guerrero Paredes
C.C 180390905-8

Vannessa Belén Andrade Males
C.C 172362255-9

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **VANNESSA BELÉN ANDRADE MALES** identificado con **C.C. N°1723622559**, de estado civil casada y con domicilio en **QUITO** a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ing. MBA. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez Barrio El Ejido Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES:

CLÁUSULA PRIMERA. - **LA/EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de **MEDICINA VETERINARIA** titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **PROYECTO INVESTIGATIVO** la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad según las características que a continuación se detallan:

Historial académico. - **septiembre 2012 –febrero 2020**

Aprobación HCA. - 15 de noviembre 2019

Tutor. - . **MSc. Fabián Manuel Guerrero Paredes**

Tema: **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CIANOCOBALAMINA SOBRE EL DESARROLLO DE OVOCITOS RECUPERADOS DE OVARIOS BOVINOS POST MORTEM DE CENTROS DE FAENAMIENTO, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- f) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. -El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 7 días del mes de febrero del 2020.



.....
Vannessa Belén Andrade Males
EL CEDENTE

.....
Ing. MBA Cristian Tinajero Martínez
EL CECIONARIO

AVAL DEL TUTOR DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Latacunga, 07 de febrero del 2020

En calidad de Tutor del Trabajo de Investigación sobre el título:

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CIANOCOBALAMINA SOBRE EL DESARROLLO DE OVOCITOS RECUPERADOS DE OVARIOS BOVINOS POST MORTEM DE CENTROS DE FAENAMIENTO, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, de VANNESSA BELÉN ANDRADE MALES, de la carrera MEDICINA VETERINARIA, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Tutor



MSc. Fabián Manuel Guerrero Paredes

C.I 180390905-8

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprueban el presente Informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi, por la **Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Carrera de Medicina Veterinaria**; por cuanto la postulante: **Andrade Males Vanessa Belén** con el título de Proyecto de Investigación : **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CIANOCOBALAMINA SOBRE EL DESARROLLO DE OVOCITOS RECUPERADOS DE OVARIOS BOVINOS POST MORTEM DE CENTROS DE FAENAMIENTO, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”**, a considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de Sustentación de Proyecto.

Latacunga 07 Febrero 2020

Para constancia firman:



Lector 1 Presidente
PHD. Edilberto Chacón Marcheno
CC: 175698569-1



Lector 2
PHD. Rafael Garzón Jarrin
CC: 050109722-4



Lector 3 Secretario
Mg. Edie Molina Cuasapaz
CC: 172254727-8

AGRADECIMIENTO

“El agradecimiento es la memoria del corazón”

Lao Tsé

Agradezco a Dios porque sé que él fue mi sustento en momento difíciles, quien me dio fortaleza y aliento para seguir cada día, porque al sentir ese palpito en mi pecho sabía que había una nueva oportunidad cada día al despertar y que mi propósito aún no termina.

Quiero agradecer a todos mis docentes quienes al impartir su conocimiento me ayudaron a formarme y formar mi carácter, gracias a cada uno por sus palabras de ánimo, también agradezco a mis padres y hermanos ya que ellos me ayudaron a superar los obstáculos con su apoyo. Mi familia en general es quien permanece con sus palabras de motivación, gracias.

Extiendo un agradecimiento especial a quienes me apoyaron dentro de mi proyecto de investigación por su motivación, apoyo y guía mil gracias.

Gracias a ASOGAN que me extendió una ayuda significativa dentro del proyecto, fueron un pilar importante para seguir.

Vannessa Belén Andrade Males

DEDICATORIA

Dedicado con cariño y amor a mi pequeña hija Arely que con su dulzura me impulsaba a seguir, tu hija mía eres el destello que alumbra mi camino, gracias por existir.

Dedicatoria a todas las personas que forman parte de mi vida que de manera directa o indirecta permitieron hacer mi sueño realidad, gracias por mi familia que me ayudo a subir un peldaño más en mi vida y formación.

Vannessa Belén Andrade Males

TITULO: “EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CIANOCOBALAMINA SOBRE EL DESARROLLO DE OVOCITOS RECUPERADOS DE OVARIOS BOVINOS POST MORTEM DE CENTROS DE FAENAMIENTO, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”

AUTOR: VANNESSA BELÉN ANDRADE MALES

RESUMEN

El presente proyecto se basa en la aplicación de técnicas de reproducción asistida con el fin de contribuir y favorecer al mejoramiento sustancial de la producción ganadera por medio de la técnica de ovum pick up (OPU) que consiste en la recolección de ovarios post mortem para la utilización de ovocitos con el fin de aprovechar los recursos biológicos y emplearlos en el estudio de desarrollo de ovocitos con la adición de cianocobalamina. Este estudio tiene como objetivo la evaluación del efecto de la cianocobalamina sobre el desarrollo de ovocitos post mortem con la finalidad de probar la eficiencia de la misma en el medio de mantenimiento y evaluación de ovocitos. El proyecto se realizó en el laboratorio de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi se desarrolló mediante la recolección de 60 ovarios de vacas post mortem de dos centros de faenamiento, los ovarios fueron recolectados tras el sacrificio del animal haciendo un corte con tijeras y a continuación se los colocó en una funda ziplop que contenía 400ml de cloruro de sodio al 9% atemperado a 38,5 °C. Los ovarios fueron transportados a una temperatura de 38,5 en un termo isotérmico hasta la llegada al laboratorio, se procedió a realizar la técnica para aspiración folicular y la recuperación de ovocitos que al ser categorizados y evaluados se les dividió en dos grupos siendo el grupo control T0 y el grupo tratamiento T1 ambos fueron evaluados al transcurrir las 12 horas y 24 horas obteniendo los resultados del proyecto, donde se puede decir que la adición de cianocobalamina no genera un impacto relevante en el medio de evaluación y mantenimiento de ovocitos.

Palabras clave: ovocitos, aspiración folicular, evaluación, morfología, y cianocobalamina.

TOPIC: “EVALUATION OF THE EFFECT OF CYANOCOBALAMIN ON THE DEVELOPMENT OF BOVINE OOCYTES RECOVERED FROM OVARIES POSTMORTEM SLAUGHTER CENTERS AT THE LABORATORY OF REPRODUCTIVE BIOTECHNOLOGY CAREER OF VETERINARY MEDICINE AT THE TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI”

AUTHOR: VANNESSA BELÉN MALES ANDRADE

ABSTRACT

This project is based on the application of assisted reproduction techniques in order to contribute and favor the substantial improvement of livestock production by the technique of ovum pick up (OPU) consisting of collecting ovaries post mortem use of oocytes in order to exploit biological resources and use them in the study of oocyte development with the addition of cyanocobalamin. This study aims at evaluating the effect of cyanocobalamin on the development of oocytes postmortem in order to test the efficiency of it in the middle of maintenance and evaluation of oocytes. The project was conducted in the laboratory of Veterinary Medicine at the Technical University of Cotopaxi was developed by collecting 60 ovaries of cows post mortem of two centers of slaughter, the ovaries were collected after slaughter of the animal by cutting with scissors and then They are the placed in a sheath ziplop containing 400ml of sodium chloride at 9% tempered at 38.5 ° C. Ovaries were transported at a temperature of 38.5 in an isothermal heat until arrival at the laboratory, we proceeded to perform the technique for follicular aspiration and recovery of oocytes to being categorized and evaluated were divided into two groups being the group T0 control and treatment group were evaluated both T1 to the passage 12 and 24 hours to obtain the results of the project, where it can be said that the addition of cyanocobalamin does not generate a relevant impact on the means of evaluation and maintenance of oocytes.

Keywords: oocytes, follicular aspiration, evaluation, morphology, and cyanocobalamin.

ÍNDICES DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AVAL DEL TUTOR DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	vi
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN.....	vii
AGRADECIMIENTO	viii
DEDICATORIA.....	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
ÍNDICES DE CONTENIDOS	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xv
ÍNDICE DE FOTOS.....	xv
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. JUSTIFICACION DEL PROYECTO.....	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	3
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
5. OBJETIVOS.....	4
5.1 Objetivo General.....	4
5.2 Objetivos específicos	4
6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	4
6.1 Reseña histórica	4
6.2 Generales del tracto reproductivo de la vaca	5
6.2.1 Conformación del Ovario	5
6.3 Anatomía y Fisiología del Ovario.....	6
6.4 Ovogénesis.....	7
6.5 Foliculogénesis	8
6.5.1 Folículo primordial	8
6.5.2 Folículo primario o preantral.....	9
6.5.3 El paso de los folículos preantrales a folículos antrales	9
6.5.4 Folículo preovulatorio o de Graaf.	10
6.5.5 Dinámica folicular	10
6.6 Recolección y transporte de los ovarios desde el matadero.....	11
6.7 Obtención de ovocitos	12
6.8 Técnicas de recuperación de ovocitos	12

6.8.1 Aspiración folicular	12
6.8.2 Seccionamiento ovárico.....	13
6.8.3 Obtención de ovocitos in vivo	13
6.8.4 Técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonografía (Ovum pick-up; OPU) 13	
6.8.5 Recolección de ovocitos por medio de laparoscopia.....	14
6.9 Factores que afectan la calidad de los ovocitos	14
6.9.1 Edad de animal	14
6.9.2 Categoría de los animales	15
6.9.3 Condición nutricional	15
6.9.4 Factores medioambientales.....	15
6.9.5 Técnicas de recuperación de los ovocitos.....	15
6.9.6 Tamaño de los ovarios	16
6.10 Evaluación de la calidad del ovocito.....	16
6.10.1 Criterios de clasificación y denominación de los COCs (Complejo cummulus-ovocito).....	16
6.10.1.1 Denominación por categorías y calidad.....	16
6.10.1.2 Denominación por tipos Seleccionados.....	17
6.11 Clasificación de ovocitos	17
6.11.1 Categorías Ovocitarias (55).....	18
6.11.2. Denominación por categorías	19
6.12 Medios de maduración	20
6.13 Cianocobalamina.....	20
6.13.1 Estudios realizados con cianocobalamina	22
7. HIPÓTESIS	23
8. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	23
8.1 Área De Investigación	23
8.2 Unidad Experimental	23
9. VARIABLES EVALUADAS	23
9.1 Rendimiento de los ovarios Vs el número de ovocitos.....	23
9.2 Rendimiento de la cantidad VS la calidad de los ovocitos	24
9.3 Efecto de la cianocobalamina sobre los ovocitos de grano uno y grado dos.....	24
10. MANEJO DEL ENSAYO.....	24
10.1 Limpieza y desinfección del laboratorio	24
10.2 Recolección de ovarios post mortem	24
10.3 Transporte de ovarios	24
10.4 Lavado.....	24
10.5 Equilibrio de gases	25

10.6	Aspiración folicular.....	25
10.7	Valoración y categorización de los ovocitos.....	25
10.8	Tratamientos.....	25
10.9	Evaluación.....	26
10.9.1	Primera evaluación.....	26
10.9.2	Segunda evaluación.....	26
10.9.3	Tercera evaluación.....	26
11.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	27
11.1	DISCUSIÓN.....	34
11.1.1	Rendimiento de ovarios vs número de ovocitos.....	34
11.1.2	Efecto de la cianocobalamina a las 12 horas en relación al cúmulo oophorus...35	
12.	IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS).....	35
13.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	36
13.1	CONCLUSIONES.....	36
13.2	RECOMENDACIONES.....	36
14.	BIBLIOGRAFÍA.....	37
15.	ANEXOS.....	42
15.1	Imágenes.....	42
15.3	HOJA DE VIDA DEL TUTOR.....	55
15.4	HOJA DE VIDA DEL AUTOR.....	58
	APENDICE.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Categorías de ovocitos.....	18
Tabla 2	Tratamientos que se llevaron a cabo dentro del proyecto de investigación.....	25
Tabla 3	Tratamientos con sus respectivos números de ovocitos para su evaluación.....	25
Tabla 4	Evaluación del rendimiento de ovarios vs ovocitos recuperados.....	27
Tabla 5	Evaluación de ovocitos a las 0 horas en relación con el cumulus oophorus.....	28
Tabla 6	Evaluación de ovocitos a las 12 horas en relación con el cumulus oophorus.....	29
Tabla 7	Evaluación de ovocitos a las 24 horas en relación con el cúmulo oophorus.....	30
Tabla 8	Evaluación de ovocitos a las 0 horas con relación al citoplasma.....	31

Tabla 9 Evaluación de ovocitos a las 12 horas con relación al citoplasma	32
Tabla 10 Evaluación de ovocitos a las 24 horas con relación al citoplasma	33
Tabla 11 Ficha técnica	50

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Evaluación del rendimiento de ovarios vs los ovocitos recuperados	28
Gráfico 2 Evaluación de los ovocitos a las 0, 12 y 24 horas con relación a su cúmulus oophorus	30
Gráfico 3 Evaluación de los ovocitos a las 0, 12 y 24 horas con relación al citoplasma	34

ÍNDICE DE FOTOS

Fotografía 1 Recolección de ovarios camal de salcedo	42
Fotografía 2 Recolección de ovarios en el camal metropolitano de quito.....	42
Fotografía 3 Recolección de los ovarios de animales faenados	43
Fotografía 4 Preparación de medios de lavado y desarrollo de ovocitos para la estabilización de gases.....	43
Fotografía 5 Estabilización de gases de los medios de lavado y mantenimiento de ovocitos..	44
Fotografía 6 Preparación del medio de lavado de ovarios.....	44
Fotografía 7 Conteo de ovarios para la aspiración de los folículos.....	45
Fotografía 8 Lavado de ovarios para la eliminación de restos de sangre	45
Fotografía 9 Acompañamiento del tutor durante la realización de la parte práctica del proyecto de investigación	46
Fotografía 10 Evaluación de ovocitos para la selección y categorización	46
Fotografía 11 Recuperación, selección y categorización de los ovocitos	47

Fotografía 12 evaluación del grupo tratamiento a las 12 horas	47
Fotografía 13 Evaluación del grupo tratamiento a las 24 horas	48
Fotografía 14 Evaluación del grupo control a las 12 horas	48
Fotografía 15 Evaluación del grupo control a las 24 horas	49

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto: Evaluación del efecto de la cianocobalamina sobre el desarrollo de ovocitos recuperados de ovarios bovinos post mortem de centros de faenamiento, en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi

Fecha de inicio: Septiembre 2019

Fecha de finalización: Febrero 2020

Lugar de ejecución: Provincia Cotopaxi

Facultad que auspicia: Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia: Carrera de Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado: Conservación de Recursos Zoo genéticos Locales de la Zona 3 del Ecuador, incrementando su valor de uso y aporte a la soberanía alimentaria.

Equipo de Trabajo:

MSc. Fabián Manuel Guerrero Paredes (Anexo 1)

Vannessa Belén Andrade Males (Anexo 2)

Área de Conocimiento: Agricultura

Línea de investigación: Sanidad Animal

Sub líneas de investigación de la Carrera: Fisiología Animal y Reproducción

2. JUSTIFICACION DEL PROYECTO

En la actualidad el sector ganadero busca incrementar sus ingresos económicos es por ello que los ganaderos tratan de tener mayor producción de acuerdo a sus intereses ya sean este el ganado de carne o leche, abriendo paso a las técnicas de reproducción asistida con el fin de tener una mejora genética que ayude a su explotación, llevar ventaja frente a las necesidades del país obteniendo mayor número de partos en el año. Es por ello que la técnica de recuperación de ovocitos de mataderos es una alternativa que permite visualizar gran éxito ya que es mayor la cantidad de ovocitos recuperados que pueden ser aprovechables tras el desarrollo de los mismo para su maduración y estos a la vez ser fecundados in vitro he implantados en vacas receptoras, lo que favorece para tener una ganadería prospera al aumentar la reproductividad y productividad del hato (1).

La ganadería en Ecuador es una actividad que a pesar de ocupar 68 % del suelo agrícola, no contribuye de manera significativa a la economía del país (representa solo 11 % del PIB agrícola), lo que en parte refleja bajos índices de eficiencia y competitividad productiva. No obstante, el Gobierno ecuatoriano ha manifestado expectativas de exportación de cárnicos, a partir de la declaración de la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE) en 2015 como a Ecuador un país libre de fiebre aftosa con vacunación. El Gobierno ha implementado programas de mejoramiento genético, mejoramiento de pasturas y de los procesos de faenado en mataderos municipales; sin embargo, todavía hay un largo camino por recorrer para que la producción de carne de res ecuatoriana sea de calidad exportable. Según los sistemas de reproducción en 192.985 UPAs (Unidad de Producción Agropecuarias) utilizan monta libre, 133.878 monta controlada, 2.902 tienen inseminación artificial, 2.888 usan transferencia de embriones y se registra 103.296 con datos no aplicables (2).

La reproducción en la explotación pecuaria del ganado bovino es el eje de esta actividad productiva, ya que la eficiencia en la producción de crías permite cubrir las demandas comerciales, a través de la generación de hembras de alta capacidad y calidad productiva, no solo cada vez mejores en la producción, sino también en la búsqueda de una mayor población bovina (para el 2004 la población mundial de ganado vacuno era de 1,339 millones de cabezas con un incremento esperado anual del 2.8%) para una población humana creciente (1).

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

4.1 Directos

- ✓ Ganaderos del sector vinculados a la producción de los animales en estudio.

4.2 Indirectos

- ✓ Estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria en las asignaturas de genética, biotecnología.
- ✓ El investigador principal del proyecto, requisito previo a la obtención del Título en Medicina Veterinaria y Zootecnia.

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Debido a que existen diversos problemas a nivel reproductivo en las hembras bovinas como los desórdenes hormonales que son las principales causas de repetición de estro y estas pueden manifestarse de distintas maneras ya sea como un anestro, el cual puede deberse a una mala alimentación o puede ser el resultado de la incapacidad cíclica de una vaca, también se presentan los quistes ováricos el cual se cree que se genera debido a una deficiencia de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas, generando que las vacas no tengan un parto por año y esto trae como consecuencia una baja producción y rentabilidad en las distintas ganaderías afectando a la reproducción bovina y a su vez la economía (3).

El campo de la biotecnología de la reproducción ha llegado a establecerse en la actualidad como una de las áreas de mayor investigación, manejo y trabajo de la Medicina Veterinaria y Zootecnia, sus avances son cada vez muy relevantes en comparación con otras ciencias.

Una de ellas es la maduración in vitro de ovocitos que si bien es cierto es una nueva técnica, hasta la actualidad ya cuenta con diferentes estudios y conclusiones muy valederos. Dentro de lo que es la maduración ovocitaria se sabe que in vivo fisiológicamente esta necesita atravesar diferentes sucesos, en los cuales intervienen ciertos compuestos, químicos y hormonas, por lo cual el establecer un medio de maduración in vitro propicio para los ovocitos es de mucha importancia, ya que del medio elegido dependerá el porcentaje de maduración ovocitaria que se tenga (4).

Con la aplicación de las técnicas de reproducción asistida, se logra un mayor número de crías al año con un alto valor productivo llegando a alcázar la producción tanto de leche como de carne de buena calidad apta para el consumo interno del país como para la exportación de cárnicos y lácteos a nivel mundial (1).

Por esta razón se emplea este estudio del efecto que tiene la cianocobalamina en el desarrollo de los ovocitos recuperados por aspiración folicular de ovarios de matadero en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria con el fin de comparar la respuesta que ejercen los ovocitos en el medio de mantención y desarrollo.

Vale resaltar que en el Ecuador existen pocas investigaciones sobre la maduración in vitro de ovocitos, por lo cual la presente investigación se orienta a generar una base provechosa dentro del área de la biotecnología de la reproducción.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la cianocobalamina sobre el desarrollo de ovocitos recuperados de ovarios bovinos post mortem de centros de faenamiento, en el laboratorio de biotecnología de reproducción de la carrera de medicina veterinaria.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar el rendimiento de los ovarios en relación al número de ovocitos.
- Establecer la calidad de los ovocitos de acuerdo a su aspecto morfológico
- Evaluar el efecto de la cianocobalamina a las cero, 12 y 24 horas sobre la calidad de los ovocitos.

6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

6.1 Reseña histórica

Son varios años ya que los genetistas e investigadores vienen trabajando para mejorar genéticamente los hatos bovinos en todo el mundo, seleccionando animales genéticamente superiores en cuanto a producción se refiere. Para ello, a lo largo de todos estos años, el desarrollo y perfeccionamiento de una serie de biotecnologías reproductivas que se han convertido en herramientas fundamentales para este fin (4).

Los grandes avances en el área de la reproducción animal como son la reproducción in vitro, la clonación y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides tienen en común la necesidad de utilizar ovocitos de alta calidad o capacidad de desarrollo, factor que es clave para lograr una alta eficiencia de estas biotecnologías (5).

La aplicación de los procedimientos de fertilización in vitro (FTV) en la reproducción bovina se ha incrementado en los últimos años y en un Muro puede llegar a ser utilizada en programas de gran escala en la producción comercial de embriones in vitro. Dentro de este concepto, la recolección de ovocitos es un paso necesario para poder llegar a establecer estos programas de FIV (6).

En un inicio la técnica de ovum pick up se utilizó para la reproducción asistida en humanos, pero con el pasar de los años se pudo emplear para trabajar con animales, utilizándose por primera vez en bovinos a finales de la década de los 80 en Holanda. En el año de 1994 comenzó a aplicarse de manera rutinaria en la reproducción asistida veterinaria (7).

En esta última década, OPU se ha convertido en el mejor método de recuperación de ovocitos bovinos in vivo, permitiendo obtener ovocitos en forma repetida en animales de alto valor genético de una manera menos cruenta, ya que antes de la aparición de la ultrasonografía, se venían utilizando métodos como la laparoscopia transvaginal y la laparotomía paralumbar para la recuperación in vivo de estas gametas, pero cayeron en desuso por sus múltiples desventajas (8).

6.2 Generales del tracto reproductivo de la vaca

El tracto reproductivo de la vaca se encuentra localizado debajo del recto, el último segmento del intestino grueso. El útero, oviducto y ovarios se encuentran suspendidos en la cavidad abdominal por medio del ligamento ancho. La posición de este ligamento le permite al útero alojar al feto en crecimiento (9).

6.2.1 Conformación del Ovario

Los Ovarios: son órganos sexuales primarios pares, ubicados en la cavidad abdominal, región sublumbar, por detrás de los riñones, sostenidos por un pliegue de peritoneo, el ligamento ancho, que en el ovario se denomina mesovario (10).

Son glándulas mixtas:

- ❖ Función endocrina: es la secreción de hormonas (E2, por ejemplo).
- ❖ Función exocrina: producción de óvulos o gametas.

Estructura:

Zona externa: corteza rica en folículos.

- ❖ Epitelio germinal.
- ❖ Albugínea.
- ❖ Capa parenquimatosa, o estroma.

Zona central: médula rica en vasos sanguíneos y nervios.

6.3 Anatomía y Fisiología del Ovario

Los ovarios son las estructuras más importantes y complejas del tracto reproductor de las vacas debido a que interactúa con otras glándulas y estructuras nerviosas en el cuerpo para poder controlar el ciclo reproductivo de la vaca. El complejo ovario-hipotálamo-hipófisis se encarga de gobernar las funciones ováricas y uterinas que determinan los diferentes eventos del ciclo estral (celo y gestación). El óvulo de la vaca es fecundado normalmente por un sólo espermatozoide e inmediatamente comienza el crecimiento por una serie de divisiones. La célula individual fecundada, se divide para formar dos, luego cuatro, ocho, etc. Las partes anatómicas que componen el ovario son las siguientes: epitelio germinal, túnica albugínea, folículo primario, folículo maduro, cuerpo hemorrágico, cuerpo lúteo, cuerpo albicans, folículo atrésico e hilio (11).

Los ovarios están localizados en la parte superior de la cavidad abdominal 8 más o menos a una distancia de 30 a 45 centímetros del orificio vulvar. Cada ovario mide aproximadamente de 3 a 4 centímetros de largo por 2 a 3 de ancho. Este tamaño varía según el estado reproductivo del animal, tamaño y raza de la vaca y según la función que desempeñe el ovario en el momento del ciclo estral (folículo, cuerpo amarillo, entre otros). Además de producir óvulos, el ovario tiene como función primordial la producción de hormonas femeninas: estrógenos y progesterona, las cuales dan a la hembra sus características y comportamiento femenino (12).

Las funciones del ovario son dos: la producción de ovocitos y la síntesis y secreción de hormonas (estrógenos y progesterona). La primera función la realiza mediante dos procesos estrechamente ligados entre sí, denominados foliculogénesis y ovogénesis. Durante el desarrollo fetal y en el proceso de evolución desde gónadas indiferenciadas hasta convertirse en ovario, las células germinales primitivas dan lugar por mitosis sucesivas a las células sexuales u ovogonias, que por aumento de su masa citoplasmática se convierte en ovocitos de primer orden; estos se rodean de una sola capa de células epiteliales constituyendo los folículos primarios. En el momento del nacimiento en la corteza del ovario se encuentran varios miles de estos folículos primarios (junto a su ovocito de primer orden correspondiente), que permanecerán inactivos hasta la pubertad. La mayor parte de estos folículos sufrirán atrofia desde el nacimiento hasta la senilidad reproductiva, acelerándose este proceso a partir de la pubertad (13).

Cuando llega la pubertad, y por acción de las hormonas en la mayoría de las hembras se producen cíclicamente una serie de cambios en la corteza del ovario que tienen como

consecuencia la preparación y liberación de ovocitos (células germinales femeninas) que en caso de unirse a un espermatozoide podrán dar lugar al huevo o cigoto, que tras el proceso de gestación se convertirá en un feto a término. En el momento del nacimiento en la corteza del ovario hay miles de folículos primarios rodeando a sus correspondientes ovocitos de primer orden. A partir de la pubertad de forma progresiva y secuencial las células epiteliales periféricas de los folículos primarios se dividen y forman varias capas que rodean el ovocito recibiendo esta estructura el nombre de folículo secundario. Este sigue madurando hasta transformarse en folículo terciario y finalmente en el folículo de Graaf (terciario maduro), que sobresale de la superficie del ovario. Este proceso es llamado foliculogénesis, preside el ciclo estral u ovárico y ocurre bajo la influencia de las hormonas gonadotropinas hipofisarias (14). Una vez que el folículo de Graaf ha finalizado su maduración y que el ovocito se ha preparado mediante un proceso llamado ovogénesis. Esta consiste en la ruptura de la pared del folículo de Graaf, así como del propio epitelio del ovario y en el desprendimiento del ovocito que irá a parar en el infundíbulo. En los rumiantes y cerdas se libera un ovocito de segundo orden y se da la ovulación. Dicha ovulación produce una pequeña hemorragia en la pared del ovario instaurándose un coagulo en el folículo roto que recibe el nombre de cuerpo hemorrágico. Después se produce una organización del coagulo aumentado de tamaño y con un citoplasma rico en lipocromos que dan coloración amarillenta por lo que esta estructura recibe el nombre de cuerpo amarillo o cuerpo lúteo. En el caso de que no haya gestación el cuerpo lúteo involuciona unos días antes de la siguiente ovulación y se produce una cicatrización con invasión de tejido conectivo apareciendo una costra blanca sobre la superficie del ovario que se denominan cuerpo blanco (15).

6.4 Ovogénesis

Es el proceso de origen de los ovocitos u óvulos (16).

- ❖ Comienza en la etapa fetal, en la cual se originan ovogonias ($2n$), estas se dividen mitóticamente y se transformaran en ovocitos, los cuales inician la meiosis, deteniéndose en estado de diploteno (profase 1) a los 80 días del periodo fetal (+/).
- ❖ Son rodeados por células foliculares (pregranulosa), el individuo en este estado tiene ovocitos primarios ($2n$), estos se encuentran en un número fijo al nacer que se transformaran en óvulos (17).
- ❖ En la pubertad, cuando se produce el pico preovulatorio de LH, el ovocito primario reinicia la Meiosis, hasta la metafase II, pasándose a llamar ovocito secundario (n).

- ❖ Se forma también el cuerpo polar, en este estado se produce la ovulación, permaneciendo así hasta la fecundación con la que se completara la meiosis (16).

6.5 Foliculogénesis

Proceso de desarrollo y crecimiento folicular, continuo e irreversible.

La hembra, desde que nace, posee miles de folículos primordiales en su ovario, muchos de los cuales están destinados a permanecer como tales durante toda la vida o a sufrir atresia. Algunos, la minoría, se desarrollarán hasta el estadio de folículo preovulatorio y liberarán el ovocito que contienen en el proceso de ovulación (18).

La foliculogénesis es el proceso de maduración del folículo ovárico, una estructura compuesta por células de la granulosa que rodea el ovocito y dentro de la cual se desarrolla la ovogénesis o división meiótica del ovocito. La foliculogénesis se desarrolla de manera paralela a la ovogénesis y durante este proceso el folículo pasa por diversos estadios: folículo primordial, folículo primario, folículo secundario o preantral, folículo terciario o antral y folículo de Graaf (19).

Comienza en la etapa fetal en la cual se forma la reserva de folículos primordiales, que están formados por el ovocito primario rodeado de células foliculares planas o de la granulosa.

Un grupo de estos se activan y comienzan a crecer, transformándose en folículos primarios. La pre-granulosa se transforma en granulosa. Aparece la zona pelúcida (matriz proteica que separa el ovocito de las células de la granulosa). El folículo sigue su crecimiento, aumenta de tamaño las células de la granulosa se multiplican en varias capas, se diferencia la teca interna de la externa, en este estado se lo denomina folículo secundario (estadios preantrales). Las células de la granulosa secretan un líquido (licor folicular), que forma lagunas que coalescen formando el antro folicular, el tamaño del folículo aumenta a su máximo, denominándose folículo terciario o de Graaf. El folículo terciario en condiciones de ovular, formado por el ovocito 1°, células de la granulosa que lo rodean (corona radiada), cúmulos oophorus que fija el ovocito (18).

6.5.1 Folículo primordial

Está constituido por un ovocito primario procedente de las células germinales primitivas rodeado por una única capa de células planas originadas a partir de los cordones celulares corticales. Estas células inhiben la maduración del ovocito interrumpiendo la meiosis en la primera profase (estadio de diploteno difuso, caracterizado por la presencia de un núcleo prominente que recibe el nombre de vesícula germinal y además ejercen un efecto inhibitor sobre el crecimiento del ovocito (20).

6.5.2 Folículo primario o preantral

Las células que rodean al ovocito se hacen cúbicas y comienzan a dividirse, creando capas sucesivas en torno al mismo. Estas células están comunicadas entre sí por medio de uniones estrechas y constituyen el soporte nutritivo del ovocito. Sobre ellas aparece la lámina basal y entre el ovocito y las células foliculares se van depositando mucopolisacáridos a modo de un anillo completo, constituyendo la zona pelúcida. Por otra parte, las células fusiformes del estroma ovárico que se organizan alrededor de la membrana basal constituyen las células precursoras de la teca. Paralelamente, el efecto inhibitor que ejercían las células foliculares sobre el crecimiento del ovocito desaparece, aunque no ocurre lo mismo con la inhibición de la meiosis. De este modo, el ovocito entra en una fase de intensa actividad sintética y aumenta su volumen en ausencia de división celular, adquiriendo considerables reservas vitelinas (20).

6.5.3 El paso de los folículos preantrales a folículos antrales

Se inicia cuando el animal alcanza la pubertad. Las células de la granulosa, que han ido adquiriendo progresivamente receptores de membrana para FSH, comienzan a dividirse mitóticamente al ser estimuladas por esta gonadotropina (liberada por el efecto GnRH). A su vez, estas células producen estrógenos que incrementan la actividad mitótica de FSH; al aumentar el número y tamaño de las células foliculares, aumenta el número de receptores de membrana para FSH y el proceso se auto estimula (19). La FSH, por otra parte, promueve también la producción de líquido por las células foliculares lo que conlleva la aparición del antro. Al mismo tiempo, las células precursoras de la teca se diferencian completamente formando dos capas concéntricas, la teca interna y la teca externa. La teca interna va adquiriendo progresivamente una mayor vascularización y mayor riqueza en células epitelioideas. La teca externa, formada por fibrocitos y células mioideas con microfilamentos de actina y miosina, parece tener importancia en la contractilidad del folículo. La liberación de GnRH provoca a su vez una liberación de LH por la adenohipófisis. En el folículo se establece un mecanismo conocido como "dos células, dos gonadotropinas" mediante el cual las células de la teca interna producen andrógenos que difunden a través de la membrana basal hasta las células de la granulosa donde son transformados en estrógenos.

Al ir incrementándose la producción de fluido folicular, el antro aumenta de tamaño y el ovocito en el interior del folículo va siendo desplazado hacia una posición excéntrica (18).

6.5.4 Folículo preovulatorio o de Graaf.

Se distingue un grupo de células de la granulosa que permanecen rodeando por completo al ovocito en varias capas y mantienen el contacto con el mismo por medio de puentes citoplasmáticos, denominadas cumulus oophorus.

Durante las últimas etapas de la maduración folicular las células de la granulosa comienzan a expresar receptores para LH, que anteriormente solo se encontraban en las células de la teca. Este hecho permite al folículo responder al pico preovulatorio de LH que conducirá a la maduración del ovocito.

El pico preovulatorio de LH promueve tres cambios críticos en el folículo: la maduración del ovocito, la ovulación y la luteinización (21).

6.5.5 Dinámica folicular

Es la secuencia de crecimiento y atresia de folículos antrales que determinan la presencia de ondas decrecimiento folicular. 3 etapas (13):

- I. Reclutamiento: inicio de la onda. Un grupo de folículos antrales pequeños son reclutados por acción de las gonadotrofinas. La FSH estimula el crecimiento de estos que desarrollan receptores de LH en las células de la teca interna, lo que permite la síntesis de andrógenos, los cuales proveen el sustrato para que la FSH sintetice estrógenos para la activación de una aromatasa. Dura de 2 a 4 días.
- II. Selección: un folículo continúa creciendo y se hace dominante sobre los demás, este es responsable de casi todo el estrógeno circulante en el plasma de la hembra. Por desarrollo de más receptores o por secretar hormonas parácrinas inhiben el desarrollo de los demás.
- III. Dominancia: el folículo seleccionado crece más que los otros, que se atresian paulatinamente. En esta etapa hay 3 fases:
 1. De crecimiento
 2. Estática:
 - I. Temprana.
 - II. Tardía.
 3. Regresión: atresia en presencia de un cuerpo lúteo funcional siendo alta la concentración de P4 en la fase lútea. El estrógeno producido por el folículo dominante potencia la RAN de la P4 sobre GnRH, disminuyendo la frecuencia de pulsos de LH y FSH, atresándose el folículo. Posteriormente disminuye la concentración de estrógeno, aumenta FSH y se inicia una nueva onda de crecimiento folicular (21).

6.6 Recolección y transporte de los ovarios desde el matadero.

Se realiza a partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de los folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm (22).

La recuperación de ovarios en el matadero se realiza mediante la intervención del recolector en el inicio de la cadena de matanza. Los ovarios se obtienen de vacas o novillas en diferentes estados fisiológicos dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de los folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm (23) (24).

Los ovarios recogidos son colocados en un termo de transporte que contiene solución salina (0.9% NaCl), o solución fosfato-tamponada salina (PBS). Estas soluciones contienen generalmente, como antibióticos 25 mg/l de kanamicina, o 100 UI/l de penicilina y 100 mg/l de gentamicina (25).

La temperatura de transporte según (19) citado por (26), puede ser temperatura ambiente, sin embargo, se ha demostrado que el mantenimiento de la temperatura durante el transporte a 30°C es importante ya que, por debajo de esta, se ve comprometida la capacidad de maduración del ovocito in vitro (27).

El transporte de los ovarios al laboratorio se realiza desde los 30 minutos a las 6 h. después de la recolección (25).

Una vez se encuentren en el laboratorio los ovarios se lavan repetidamente en la solución de transporte. En seguida, los ovocitos pueden ser recogidos de inmediato, o bien, se colocan los ovarios en baño termostático a 38°C antes de proceder a la obtención de los ovocitos (26).

Esta técnica suministra una fuente abundante de ovocitos obtenidos a bajo costo, provenientes de animales en diferentes estados de ciclo estral, que pueden ser madurados, crio preservados, fertilizados y cultivados in vitro hasta alcanzar estados avanzados de desarrollo embrionario (28).

También es útil para un último aprovechamiento de hembras sacrificadas por motivos sanitarios, accidentes o reposición (29).

Los embriones se producen a partir de óvulos (ovocitos) recuperados de ovarios provenientes de animales que se envían a faena o vacas castrada, por cada vaca (2 ovarios recuperados) se pueden obtener entre 15-20 óvulos lo que permitirá obtener 4-6 óvulos para transferir (30).

Los ovocitos son en general obtenidos en el matadero a partir de ovarios de vacas y vaquillonas no preñadas, aunque hasta el momento no existe evidencia que la producción de ovocitos a partir de ovarios con un CL de gestación sea diferente. Los ovarios contienen un

gran número de ovocitos en diferentes estadios de desarrollo. El transporte de los ovarios se lleva a cabo en un termo que contiene una solución PBS o en una solución salina a temperatura ambiente pudiéndose conservar entre 20-25 °C durante 6-7 horas sin que afecte la capacidad de desarrollo posterior. En el laboratorio los ovocitos son obtenidos junto a su líquido folicular (31).

6.7 Obtención de ovocitos

La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se tornarían en folículos atrésicos, con el fin de aprovechar el máximo potencial genético de una donadora por procedimiento in vitro (32). El número de ovocitos que se pueden madurar in vivo se ve limitado gracias al feed back de la regulación endocrina del crecimiento del folículo con el proceso de maduración (33).

la obtención de los ovocitos se realiza a través de dos procedimientos básicos (34):

- A partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de los folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm.
- A partir de animales vivos utilizando la aspiración transvaginal eco guiada (OPU). Esta técnica permite recoger ovocitos en las hembras de más de 6 meses de edad, durante los primeros 3 meses de gestación y a partir de las 2-3 semanas del postparto, por lo que no interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de las hembras donantes. En el caso de hembras muy jóvenes (menos de 6 meses de edad) es necesario recurrir a la laparoscopia.

6.8 Técnicas de recuperación de ovocitos

6.8.1 Aspiración folicular

Este método consiste en la aspiración de los folículos que se encuentran en la superficie ovárica y que tienen un diámetro mayor a 2 mm (35), aunque se ha indicado que se deben aspirar aquellos folículos que se encuentran entre 3 y 6 mm de diámetro (36). La aspiración se realiza con una aguja con un calibre entre 18 y 21 G conectada a una jeringa de 10 ml. El calibre de la aguja empleada tiene mucha importancia para preservar la integridad de los ovocitos. En un estudio donde compararon diferentes diámetros de agujas frente a la calidad de los ovocitos, se determinó que, aunque con las agujas de calibre 18 G se obtuvo mayor número de ovocitos, con las agujas de menor calibre se recuperaron más ovocitos de buena calidad (37).

La técnica consiste en cargar 1-2 ml de PBS en la jeringa conectada a la aguja, y luego proceder a succionar los folículos de la superficie ovárica que se encuentren entre los diámetros recomendados. Para realizar esta operación se ingresa por el estroma del ovario

adyacente al folículo y este no se punciona directamente para evitar comprometer la integridad del mismo. Una vez obtenido el líquido folicular, se coloca en un tubo de precipitación dejándolo decantar por 10 a 20 minutos, para posteriormente eliminar el sobrenadante y aspirar y coloca el pellet en una caja Petri con PBS, con el fin de hacer la búsqueda y selección de los ovocitos aptos para continuar con la fase de maduración, bajo una lupa estereoscópica (36) (35).

6.8.2 Seccionamiento ovárico

A este método se lo conoce también con el nombre en inglés “slicing”, que básicamente consiste en hacer varios cortes longitudinales y transversales en la superficie ovárica, con el fin de seccionar los folículos localizados en la corteza ovárica y obtener los COCs que son recogidos en un vaso precipitado luego lavar el ovario (38).

6.8.3 Obtención de ovocitos in vivo

Los ovocitos se obtienen de animales vivos, ya sean hembras jóvenes, vacas en producción o de descarte. Permite entre otras cosas acortar el intervalo generacional de animales genéticamente superiores, produciendo un número elevado al año de embriones viables y terneros por cada donadora, incrementando además la eficiencia productiva de los hatos ganaderos (39).

6.8.4 Técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonografía (Ovum pick-up; OPU)

Es una técnica muy difundida a nivel mundial hoy en día, que ha permitido la recuperación repetida de ovocitos en vaquillas mayores a 6 meses de edad, en animales gestantes durante los tres primeros meses de gestación y también en vacas en producción, 2-3 semanas postparto, sin interferir con el ciclo productivo ni con el desempeño reproductivo de ellas. Por otro lado, esta técnica se puede aplicar al mismo animal durante 5-6 meses seguidos, con una frecuencia de aspiración de dos veces por semana, sin tener efectos nocivos sobre la actividad reproductiva ni el bienestar animal (36).

Para llevar a cabo este procedimiento primero es necesario sedar levemente al animal con Xilacina I.M. al 2%, o también con detomidina (0,016 mg/kg de peso vivo IV). Luego de esto, se debe aplicar anestesia epidural con el propósito de disminuir las contracciones abdominales y facilitar la manipulación de los ovarios y la operación de aspiración folicular. Una vez realizado esto, se procede a vaciar el recto teniendo cuidado de no permitir que ingrese aire al mismo, e inmediatamente a limpiar la zona perineal. La realización del OPU se basa en la

utilización de un ecógrafo con un transductor de 5 o 7.5 MHz, al cual se le acopla una aguja conectada a una bomba de vacío. El transductor se introduce por la vagina hasta el fondo de la misma, y luego por medio de manipulación rectal de los ovarios estos se retraen cerca del transductor, se visualizan los folículos y se aspiran los tengan un diámetro mayor a 2mm a través de la pared vaginal, depositándose el líquido folicular en tubos que contienen medio de mantenimiento (38).

6.8.5 Recolección de ovocitos por medio de laparoscopia

Anteriormente se empleaba la laparoscopia como técnica para la recuperación de ovocitos, que tenía como ventaja el bajo costo del equipo en comparación con el de OPU que es mucho más costoso. En la actualidad esta técnica ha caído en desuso debido a varias desventajas, por ejemplo, que no se puede visualizar el corte de pequeños folículos en crecimiento por debajo de la superficie del ovario, por otra parte, se conoce de efectos adversos relacionados con el bienestar animal, como la formación de adherencias en el lugar de la cirugía, además de ser una técnica muy invasiva (39).

6.9 Factores que afectan la calidad de los ovocitos

Sin lugar a duda existen muchos factores que afectan la calidad y cantidad de los ovocitos que pueden ser obtenidos en un animal; estas afecciones pueden comprometer la competencia funcional de los ovocitos así como también alterar sus características morfogénicas, todo lo cual puede evidenciarse en la capacidad de estos para madurar, ser fecundados, clivar y alcanzar el estadio de blastocisto (7).

La calidad del ovocito se ve afectada por factores animales y/o ambientales. Dentro de los animales se encuentran: la edad del animal, en donde el mayor problema se encuentra en las vacas muy jóvenes o muy viejas, lo que no implica que no se puede realizar la MIV ya que existen reportes de MIV a estas edades extremas e incluso se han sometido a maduración ovocitos recuperados de fetos, pero con un bajo porcentaje de MIV (40).

Otro factor es la categoría del animal, es decir si son vacas o vaquillonas; el estado del ciclo estral; y la condición corporal. Por otro lado, los factores ambientales: la temperatura, cantidad de luz por día y la estación del año (40).

6.9.1 Edad de animal

Los ovarios de vacas adultas generan menos ovocitos que las que proporcionan las novillas (30). Sin embargo, los ovocitos de las hembras pre-púberes son menos aptos que los que se obtiene de vacas adultas (41). Se pueden obtener ovocitos tanto de animales jóvenes como de

animales viejos, pero estos no se desenvuelven de forma igual al momento de los procesos biotecnológicos (7). El número aproximado de folículos preantrales para una vaquilla es de 109 000 y para una vaca es de 89 000, sin embargo, este número disminuye con el paso de los años (42).

6.9.2 Categoría de los animales

La variabilidad que existe entre animales de carne y leche es obviamente notoria, la diferencia que existe entre las razas influye en la recuperación de los ovocitos, las hembras de raza *Bos indicus* genera un número mayor de ondas foliculares e igualmente la población folicular es mayor que las de raza *Bos Taurus* (42).

6.9.3 Condición nutricional

La importancia de la nutrición sobre la calidad de los ovocitos es un tema que actualmente no se ha explotado totalmente y la información es limitada (43). La nutrición afecta contundentemente la reproducción de las vacas, exceso o deficiencia de nutrientes, el bajo consumo de materia seca, la alimentación inadecuada en el periodo de transición puede afectar seriamente a los ovocitos (44), así como también las dietas altas en amoníaco interfiere en la disponibilidad de ovocitos competentes (7).

6.9.4 Factores medioambientales

La zona termo neutral para los bovinos va de 0 a 16°C, y se produce estrés calórico cuando la temperatura supera los 23.6°C, lo cual reduce la intensidad y duración del estro de 20 horas a 11.9 horas, afecta la duración del ciclo estral (45), así como también la capacidad de los ovocitos para madurar, ser fecundados, y desarrollarse al estado de blastocisto (46).

6.9.5 Técnicas de recuperación de los ovocitos

El porcentaje de recuperación de ovocitos de ovarios recolectados del camal es de 50 a 60% con la bomba de vacío de OPU siendo una técnica muy usada; sin embargo, la presión que se use determinara el daño que sufra las células del cúmulo (7).

Existe pocas diferencias entre la recuperación de ovocitos post mortem o in vivo, por un lado, resulta con un grado mayor de complejidad la manipulación transrectal del ovario frente a la observación completa y detallada que puede realizar el operario en los ovarios recolectados de vacas faenadas (19).

La técnica OPU puede ser usada en vacas en distintos estados fisiológicos, existen factores técnicos como la aguja, la experiencia del operador que pueden influenciar negativamente en

la recuperación de los ovocitos, sin embargo, es un método recomendado cuando se desea conservar el animal donante (47).

6.9.6 Tamaño de los ovarios

El número de ovocitos está estrechamente relacionado con el tamaño y peso del ovario, por lo tanto, en vacas adultas el número de ovocitos que se puede recuperar es mayor que en hembras jóvenes (7).

6.10 Evaluación de la calidad del ovocito

El eje central de la reproducción asistida es la calidad del ovocito, ya que uno de los mayores inconvenientes encontrados ha sido reconocer el estadio de maduración de los ovocitos, en donde el citoplasma juega un papel importante. El factor limitante para la colección de Complejo Cummulus-Ovocito (COC) es indudablemente el tamaño de los folículos de los cuales se extraen (32).

6.10.1 Criterios de clasificación y denominación de los COCs (Complejo cummulus-ovocito)

La selección de los ovocitos se realiza generalmente en base a tres criterios: el diámetro del ovocito, el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo que los rodea, adicionalmente, los ovocitos rodeados por un cúmulo compacto formado por varias capas de células presentan mayores porcentajes de maduración (34).

La apreciación de características morfológicas son la base de diversos esquemas de clasificación, basados en la compactación, estructuras celulares, entre otras características visibles bajo estereo microscopio (40).

6.10.1.1 Denominación por categorías y calidad

Los complejos cúmulus ovocitos (COCs) son evaluados por su morfología y clasificados dentro de 4 categorías:

- ❖ Completamente rodeados por mayor o igual a 3 capas de células de cúmulus con citoplasma homogéneo eventualmente granulado.
- ❖ Ovocitos rodeados con < 3 capas de células del cúmulus y citoplasma generalmente homogéneo.
- ❖ Ovocitos desnudados y citoplasma con apariencia irregular con zonas oscuras.
- ❖ Ovocitos con cúmulus expandido y/o citoplasma irregular.

Los COCs se clasifican como viables (calidad 1 y 11), para los procesos de maduración y fertilización in vitro (45).

6.10.1.2 Denominación por tipos Seleccionados

Los ovocitos, se clasifican en tres categorías, según la morfología del cúmulo de células que lo rodean (48):

- ❖ Ovocitos tipo A. Presentan un cúmulo con más de 5 capas de células.
- ❖ Ovocitos tipo B. Están rodeados tan sólo por 3-5 capas celulares.
- ❖ Ovocitos tipo C. Se encuentran desnudos o parcialmente desnudos de células del cúmulo.

6.11 Clasificación de ovocitos

Los aspectos más importantes que evalúan la calidad del ovocito son: Estado nuclear, características citoplasmáticas, aspectos de la corona radiada y la expansión o distribución de las células del cúmulo (49), así como el diámetro de los ovocitos, que condicionan su capacidad para madurar de tal forma que los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110 µm se encuentra todavía en fase de crecimiento y no han adquirido la capacidad para madurar (50).

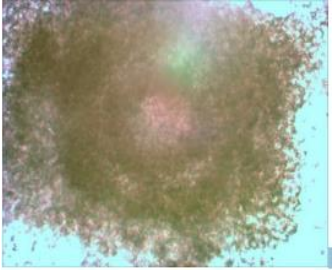
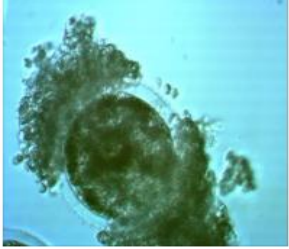
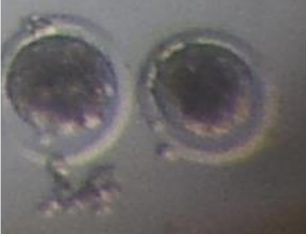
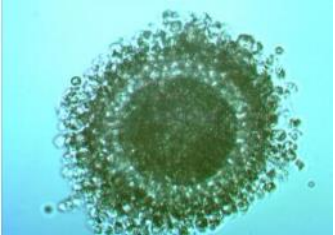
La morfología del citoplasma y las células del cúmulo son los primeros criterios para discriminar entre ovocitos competentes o incompetentes para el desarrollo embrionario, la calidad de las células que rodean el ovocito y la apariencia homogénea de citoplasma son los mejores indicadores para determinar si el ovocito posee potencial para madurar y fecundar in vitro (51), las células del cúmulo son subpoblaciones de células de la granulosa que aportan los nutrientes al ovocito durante su crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida, y sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización (52).

Por lo tanto los ovocitos se pueden clasificar según estos criterios, según las capas de células del cúmulo y la homogeneidad y apariencia del citoplasma, aunque las categorías de clasificación varían en número según los autores con importancia científica y para controlar la calidad de la producción y recolección de los ovocitos, existen clasificación de 2, 3 y 4 categorías (53) (54), las que he valorado como más relevante, el tipo A corresponde a un ovocito corresponde a un ovocito con células del cúmulo con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente; el tipo B tiene capas múltiples del cúmulo (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras (55); el tipo C se caracteriza por tener un cúmulo desnudo y un citoplasma irregular con zonas oscuras; el tipo D tiene el cúmulo con células expandidas y un citoplasma irregular y

con zonas oscuras , Aunque por otra parte un ovoplasma negro indica que el ovocito esta envejecido y tiene bajo el potencial para soportar el desarrollo (56) .

6.11.1 Categorías Ovocitarias (55).

Tabla 1 Categorías de ovocitos

Categoría A	<p>Corresponde a un ovocito con células del cúmulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente.</p>	
Categoría B	<p>Tiene capas múltiples del cúmulus (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras.</p>	
Categoría C	<p>Se caracteriza por tener un cúmulus desnudo y un citoplasma irregular con zonas oscuras.</p>	
Categoría D	<p>Tiene el cúmulus con células expandidas y un citoplasma irregular y con zonas oscuras</p>	

La maduración de cada tipo de ovocitos siempre se realiza de manera independiente de los otros tipos.

6.11.2. Denominación por categorías

Los ovocitos se clasifican como aptos (categorías I y II) y no aptos (categorías III y IV) para la MIV, basándose en las características de las células del cúmulus oophorus y corona radiada y la homogeneidad del citoplasma (38).

- ✓ Los ovocitos categoría I (excelentes) presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 o más capas compactas del cúmulus
- ✓ Ovocitos categoría II (buenos) presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa pero menos de 5 capas del cúmulus.
- ✓ Ovocitos categoría III (regulares) presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del cúmulus presentes son menos compactas.
- ✓ Ovocitos categoría IV (malos) presentan citoplasma no homogéneo o fragmentado y las células de la corona y del cúmulus se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad (25).

a) Expansión del cúmulus celular

El criterio de expansión del cúmulus es el siguiente (48):

- ❖ Expansión nula. No existe expansión apreciable del cúmulo.
- ❖ Pequeña expansión de aproximadamente un diámetro del ovocito.
- ❖ Expansión apreciable, de unos dos diámetros del ovocito.
- ❖ Expansión máxima, de más de tres diámetros del ovocito, e incluso de las células de la corona radiada.

b) Diámetro del ovocito

Los ovocitos al adquirir diámetros superiores a 110 μm alcanzan la capacidad para completar la meiosis, los cuales corresponde a los folículos con 2-3 mm (57).

La selección de los ovocitos se realiza generalmente en base a tres criterios: el diámetro del ovocito, el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo que los rodea. El diámetro de los ovocitos condiciona su capacidad para madurar, de tal forma, que los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110 μm se encuentran todavía en fase de crecimiento y no han adquirido aun la capacidad para completar la meiosis I (16).

La tasa de maduración nuclear aumenta con el diámetro del ovocito, lo que sugiere que los ovocitos con diámetro inferior a 110 μm están aún efectuando la síntesis de ARN, y, por consiguiente, todavía se encuentran en fase de crecimiento, es decir, no han completado la

maduración nuclear y citoplasmática. No obstante, cuando el diámetro ovocitario supera los 110 μm la mayoría de los ovocitos se desarrollan hasta MII (11).

Los ovocitos pequeños tienden a seguir un patrón anormal de maduración meiótica dando como resultado disturbios en los procesos de maduración (7).

6.12 Medios de maduración

Los medios de cultivo utilizados en ganado para MIV pueden ser ampliamente divididos en simples y complejos. Los medios simples son usualmente sistemas de buffer de bicarbonato, que contienen sales fisiológicas básicas con la adición de piruvato, lactato y glucosa. La principal diferencia entre varias formulaciones de medios simples se encuentra en diferencias en la concentración de iones y los niveles de las fuentes de energía. Por otro lado, los medios complejos, contienen adicionalmente aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias. Es necesario poner atención, en los medios de maduración al manejo de otros factores como en el pH, la osmolaridad, la temperatura, la fase gaseosa, la humedad y el tiempo de maduración. Los medios de maduración son generalmente enriquecidos con una gran diversidad de suplementos, tanto séricos como hormonales, que favorecen la capacidad del ovocito para madurar in vitro. El agua es el componente mayoritario en el medio para MIV, es así que, un agua de buena calidad es esencial para la preparación del medio (40).

La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% CO_2 en aire para la maduración, esto por su similitud a los porcentajes registrados en el oviducto de algunas hembras mamíferas (33).

El medio de maduración TCM-199 (por sus siglas en inglés: Tissue culture medium), es un medio complejo que utiliza como Buffer al bicarbonato o a HEPES y es común mente suplementado con diferentes tipos de sueros, y/o hormonas (gonadotropinas y/o esteroides) (40). Es el más ampliamente usado para estudios de la maduración de ovocitos bovinos (58) (59) (60). Los aditivos más comunes usados para MIV de ovocitos en TCM-199 son FSH5, LH6, suero fetal bovino (SFB), y recientemente algunos factores de crecimiento como ephidermal growth factor (EGF) e insulin-like growth factor-I (IGF-I) (61).

6.13 Cianocobalamina

Nutriente del complejo de la vitamina B que el cuerpo necesita en pequeñas cantidades para funcionar y mantenerse sano. La cianocobalamina ayuda a producir glóbulos rojos, ADN, ARN, energía y tejidos, y mantener sanas las células nerviosas.

La vitamina B12 es una vitamina hidrosoluble del grupo B también denominada cobalamina, que es cristalina y de color rojo y contiene metal cobalto en su composición. La vitamina

B12 es, en realidad, un conjunto de moléculas con características, estructuras y funciones similares.

CATOSAL^R-B12

Solución inyectable - de Bayer es el estimulante metabólico que mezcla fósforo orgánico Butafosfano y vitamina B12 que estimula los procesos y mejora todos los índices productivos y reproductivos de los animales.

Para animales sanos:

- En los reproductores machos para mejorar su eficiencia genética
- En las vacas lecheras sometidas al esfuerzo intenso de la lactancia
- Para preparar animales para exposiciones
- Para mejorar el estado general y el rendimiento
- Como tónico general en los caballos de carrera, de polo, trote, etc.
- Para fomentar el crecimiento de animales jóvenes
- Para acortar la muda en las aves

Para trastornos metabólicos generales:

- Esterilidad
- Deficiencias sexuales
- Deficiente desarrollo
- Retención de placenta
- Estados de decaimiento general como por ejemplo inapetencia y agotamiento muscular
- Trastorno metabólico general de los bovinos en época de sequía caracterizados por indigestión crónica, desnutrición, baja producción láctea, fenómenos nerviosos, etc.
- Malacia y canibalismo en las aves
- Histeria de las aves.

Enfermedades agudas y crónicas:

- Anemias
- Fracturas
- En la calcio terapia como auxiliar; por ejemplo, en parresia del parto
- Convalecencia de todas las enfermedades
- Lumbago del caballo
- Debilidad vital y enfermedades de los recién nacidos αIntoxicación (como

coadyuvante)

- Trastornos del desarrollo de los animales
- Fatiga de jaula en aves

6.13.1 Estudios realizados con cianocobalamina

¿Cómo mejorar con el uso de Catosal®B12 los índices reproductivos de las vacas con desórdenes ováricos?

Catosal®B12 contiene butaphosphano y cianocobalamina (vitamina B12); que estimulan el metabolismo en general, estimula el sistema inmunológico, estimula la biosíntesis de metionina y de proteínas, aumenta los procesos de hematopoyesis (formación de glóbulos rojos), mejora las funciones del hígado y la digestión, ayuda en la regeneración de tejidos, mejora la absorción y asimilación de nutrientes, principalmente la de los minerales contenidos en la dieta o los pastos.

Media hora antes de la inseminación artificial, las vacas del grupo II recibieron 10 ml Catosal®B12 subcutáneo en el tercio medio del cuello, y GnRh por vía subcutánea una hora después de la inseminación.

La administración de **Catosal®B12** y GnRh ayudó a incrementar la capacidad de fertilización en los animales tratados en un 20-35 % (95%), mejoró los índices de inseminación a 1.1 y disminuyó en 12 y 33 el promedio de días abiertos.

En conclusión, la combinación de GnRh con Catosal®B12 aumentó la estimulación a celos más fértiles y se crearon condiciones óptimas para la maduración de ovulo, una correcta formación y ovulación del folículo (62).

Efecto de Catosal®B12 en vacas lecheras y su relación con la actividad ovárica

A 10 vacas control no se les aplicó el programa de Catosal®B12 3x4R12. Se realizó un examen tocológico y por método de ultrasonografía, se determinó presencia o ausencia de cuerpo lúteo y de folículos. Se obtuvo una muestra sanguínea de la vena caudal antes del programa y al finalizar éste para determinar por la técnica de radioinmunoensayo niveles de progesterona, estrógenos, y perfiles sanguíneos de insulina y hepático.

Los animales tratados con Catosal®B12 presentaron una elevación significativa en la concentración de estrógenos, mejoraron los niveles de insulina y se redujo el perfil hepático de transaminasas.

De los resultados obtenidos a las mediciones de hormonas en sangre, se concluye que la aplicación intramuscular de Catosal®B12 con un Programa 3x4R12, es decir, cada cuatro

días, tres aplicaciones, produce una elevación en las concentraciones de estrógenos en sangre y desarrollo del folículo presente al momento de inicio del tratamiento.

El programa Catosal®B12 3x4R12 provocó un alza considerable en los niveles de insulina la cual está involucrada en el metabolismo de la glucosa. La bilirrubina bajó considerablemente en las vacas tratadas con Catosal®B12 (63).

7. HIPÓTESIS

La cianocobalamina pudiera afectar el desarrollo de ovocitos, determinando la calidad morfológica del mismo.

8. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo se sustenta en una investigación de campo de tipo experimental que permite analizar la eficiencia de la Cianocobalamina y su respuesta al desarrollo con relación al número y calidad de ovocitos con su valoración morfológica.

8.1 Área De Investigación

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria en la Universidad Técnica de Cotopaxi.

La Provincia de Cotopaxi está localizada en la región Sierra de país, al centro-norte, se encuentra a 2.800 metros sobre el nivel del mar. En General la provincia posee una temperatura media anual de 12 °C, por lo que cuenta con un clima templado, frío y cálido húmedo. Con una población total 409.206 habitantes, densidad 62,29 hab/km², superficie total 6 569 km².

8.2 Unidad Experimental

La presente investigación se realizó con 60 ovarios de vacas post mortem de centros de faenamiento.

9. VARIABLES EVALUADAS

9.1 Rendimiento de los ovarios Vs el número de ovocitos

El rendimiento de los ovarios se determinó por la cantidad de ovocitos que se recuperaron dentro de la aspiración folicular.

9.2 Rendimiento de la cantidad VS la calidad de los ovocitos

Se efectuó mediante el número total de los ovocitos recolectados y la selección de los ovocitos entre grado uno y grado dos, es decir realizando una discriminación y acuerdo a las categorías descritas en la literatura.

9.3 Efecto de la cianocobalamina sobre los ovocitos de grano uno y grado dos

Para realizar la determinación de esta variante se realizó la evaluación de la placa control y la placa tratamiento a las 0, 12 y 24 horas tras mantenerse en la estufa y con los medios de mantenimiento.

10. MANEJO DEL ENSAYO

Se realizaron un total de seis ensayos previos a la obtención de los resultados para establecer un protocolo que permitió hacer las correcciones pertinentes en el proyecto de investigación.

En cada ensayo se tomaron la misma cantidad de ovarios es decir 60 por cada colecta llegando a una totalidad de 360 ovarios dentro de nuestro trabajo, cabe recalcar que el último ensayo es el que permitió obtener resultados en la investigación, mientras que los anteriores ensayos fueron de prueba para ir perfeccionando y mejorando la técnica.

10.1 Limpieza y desinfección del laboratorio

En el laboratorio se realiza una desinfección con anterioridad a la llegada de las muestras ováricas este se lo efectuó con alcohol al 70% y clorhexidina jabonosa al 10% en el área de trabajo.

10.2 Recolección de ovarios post mortem

El último ensayo fue el que se tomó en cuenta para la obtención de resultados el cual consistió en la recolección de 60 ovarios de vacas faenadas en el camal metropolitano de Quito. La recolección de los ovarios se los hizo por corte con tijeras quirúrgicas y puestos en solución fisiológica al 9% atemperada.

10.3 Transporte de ovarios

Los ovarios fueron transportados en solución fisiológica de cloruro de sodio al 9% a temperatura de 38°C hasta la llegada al Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción.

10.4 Lavado

En primer lugar, se procedió hacer el lavado de los ovarios por tres ocasiones con solución fisiológica de cloruro de sodio al 9 % atemperada para eliminar residuos de sangre y se los deja en esa misma solución hasta la aplicación de la aspiración folicular.

10.5 Equilibrio de gases

Seguido a esto se realizó la preparación de los medios de lavado y cultivo de ovocitos estos se deben preparar al principio ya que necesitan unas dos horas de tiempo para que se produzca el equilibrio de gases para tener estabilidad y que no atenten con la integridad del ovocito, se trabajó en la plancha térmica a una temperatura de 37°C con las cajas Petri tapadas la primera contenía 10ml de lactato de ringer, la segunda 10ml de lactato más 5ml de holding y 5ml de TCM mientras que la tercera contenía 10ml de TCM.

10.6 Aspiración folicular

La aspiración folicular se realizó sin tomar en cuenta el tamaño del ovario y se extrajeron de los folículos mayores a 2 mm con jeringa de 5ml y aguja de 18 x ½, el líquido folicular obtenido se colocó en cajas Petri.

10.7 Valoración y categorización de los ovocitos

El líquido folicular obtenido se colocó en la primera caja Petri que contenía el primer medio de lavado en esta se realizó la recuperación de ovocitos sin discriminación alguna, en la segunda caja Petri se colocó los ovocitos con grado uno y dos tomando en cuenta solo la integridad del cúmulus oophorus, en la tercera caja se realiza la categorización de los ovocitos tomando en consideración el cúmulus y el citoplasma.

10.8 Tratamientos

Se realizaron dos tratamientos en los cuales se rotulan T0 como grupo control y T1 como grupo tratamiento.

Tabla 2 Tratamientos que se llevaron a cabo dentro del proyecto de investigación

Reactivos	T0 Testigo	T1 Tratamiento
TCM 199	4 ml	4 ml
SFB (suero fetal bovino)	2ml	2ml
Cianocobalamina	0	120ul

Realizado por **Vannessa Andrade**

Tabla 3 Tratamientos con sus respectivos números de ovocitos para su evaluación

	T0	T1
Grado 1	6	6
Grado2	1	1
Total	7	7

Elaborado por: Autoría propia

Ya realizado la categorización se procedió a colocar en cada caja 7 ovocitos con las mismas características morfológicas en decir seis ovocitos de grado uno y un ovocito de grado dos dando un total de 14 ovocitos que entraron en estudio. Las cajas Petri de los tratamientos fueron introducidas en la estufa a una temperatura de 38.5°C para la realización de la evaluación posterior a las 12 horas y 24 horas.

10.9 Evaluación

Las evaluaciones que se realizaron fueron tres, la primera a las cero horas, la segunda a las 12 horas tras la colocación de las cajas Petri dentro de la estufa a una temperatura de 38,5°C y estas tuvieron una tercera evaluación a las 24 horas.

10.9.1 Primera evaluación.

Se realiza a las cero horas se evalúa en el medio de mantenimiento tanto el grupo control como el grupo tratamiento que se encuentran con el número igual de ovocitos en iguales características.

10.9.2 Segunda evaluación.

Evaluación a las 12 horas se procede a hacer la evaluación en el estereoscopio para valorar su morfología.

10.9.3 Tercera evaluación.

Se realiza al transcurrir las 24 horas de mantenerse en la estufa a temperatura de 38,5, en donde al momento de evaluación se puede percibir un olor desagradable en las dos cajas Petri a ser evaluadas.

11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El análisis y alcance de los resultados se valoraron con respecto a variables cualitativas por lo tanto el método estadístico aplicado se basa a las frecuencias absolutas utilizando tablas de contingencia del programa chi cuadrado, utilizando el software Infostat, por cual presentamos las tablas de resultados obtenidas al correr los datos que se recogió durante el desarrollo de la parte partica del Proyecto de Investigación en dicho software

Tabla 4 Evaluación del rendimiento de ovarios vs ovocitos recuperados

Nueva tabla: 02/02/2020 - 22:25:46 - [Versión: 17/11/2016]

Tablas de contingencia

Frecuencias: N.º DE OVOCITOS

Frecuencias absolutas

En columnas: GRADÓ DE OVOCITOS

N.º DE OVARIOS	Ovocito G°1	Ovocito G°2	Ovocito G°3	Ovocito G°4	Total
60	0	2	0	0	2
	12	0	0	0	12
	0	0	69	0	69
	0	0	0	77	77
Total	12	2	69	77	160

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado	480	9	<0,0001
Pearson			
Chi Cuadrado MV-G2	308,39	9	<0,0001
Coef.Conting.	0,87		
Cramer			
Kappa (Cohen)	0,85		
Coef.Conting.	0,87		
Pearson			

Elaborado por: Autoría propia

En el rendimiento de ovarios vs ovocitos si encontramos una diferencia por lo que tenemos un valor de p de <0,0001 lo que se interpreta que logramos una mayor cantidad de ovocitos recuperados con relación al número de ovarios recolectados.

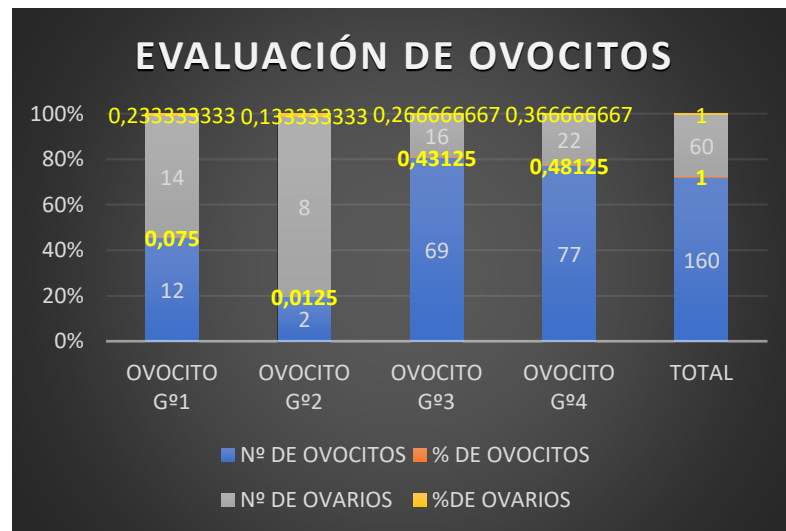


Gráfico 1 Evaluación del rendimiento de ovarios vs los ovocitos recuperados

Elaborado por: Autoría propia

Tabla 5 Evaluación de ovocitos a las 0 horas en relación con el cumulus oophorus

Nueva tabla_2: 02/02/2020 - 22:53:01 - [Versión: 17/11/2016]

Tablas de contingencia

Frecuencias: N.º ovocitos

Frecuencias absolutas

En columnas: HORAS: tratamientos

categoria	0 Horas: T0	0 Horas: T1	Total
Compacto	6	6	12
Parcial	1	1	2
Total	7	7	14

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0	1	>0,9999
Chi Cuadrado MV-G2	0	1	>0,9999
Irwin-Fisher bilateral	0		>0,9999
Coef.Conting. Cramer	0		
Kappa (Cohen)	0		

Elaborado por: Autoría propia

En la evaluación de los tratamientos a las 0 horas no se encuentra diferencia alguna ya que los dos tenían el mismo número de ovocitos en las mismas condiciones con respecto a su cúmulus oophorus.

Tabla 6 Evaluación de ovocitos a las 12 horas en relación con el cumulus oophorus

Nueva tabla_3: 02/02/2020 - 23:24:19 - [Versión: 17/11/2016]

Tablas de contingencia
Frecuencias: N.º ovocitos

Frecuencias absolutas
En columnas: HORAS:
tratamientos

<u>cat</u> goría	12 Horas: T0	12 Horas: T1	Total
Compacto	5	5	7
Desnudo	0	1	1
Expandido	1	2	3
Parcial	1	2	3
<u>Total</u>	<u>7</u>	<u>7</u>	<u>14</u>

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	2,95	3	0,399
Chi Cuadrado MV-G2	3,39	3	0,3347
Coef.Conting. Cramer	0,32		
<u>Coef.Conting. Pearson</u>	<u>0,42</u>		

Elaborado por: Autoría propia

En la evaluación a las 12 horas no se encuentra diferencia alguna por lo que se obtiene un valor de p de 0,399 lo que se interpreta de la siguiente manera; que entre los tratamientos T0 como testigo y T1 como tratamiento experimental no hay una variabilidad significativa al momento de usar la cianocobalamina como precursor de desarrollo de los ovocitos in vitro.

Tabla 7 Evaluación de ovocitos a las 24 horas en relación con el cúmulus oophorus

Nueva tabla_4: 02/02/2020 - 23:44:26 - [Versión: 17/11/2016]

Tablas de contingencia

Frecuencias: N.º Ovocitos

Frecuencias absolutas

En columnas: categoría

HORAS	Tratamiento	Compacto	Desnudo	Expandido	Parcial	Total
24	T0	2	0	2	3	7
Horas						
24	T1	0	1	4	2	7
Horas						
Total	Total	2	1	6	5	14

Estadístico	Valor	Gl	p
Chi Cuadrado Pearson	3,87	3	0,2762
Chi Cuadrado MV-G2	5,04	3	0,1689
Coef.Conting. Cramer	0,37		
Coef.Conting. Pearson	0,47		

Elaborado por: Autoría propia

La evaluación a las 24 horas no encontramos diferencia alguna entre los tratamientos obteniendo un valor de p de 0,2762 lo que interpretamos que la aplicación de cianocobalamina como precursor de desarrollo in vitro de ovocitos no funciona.

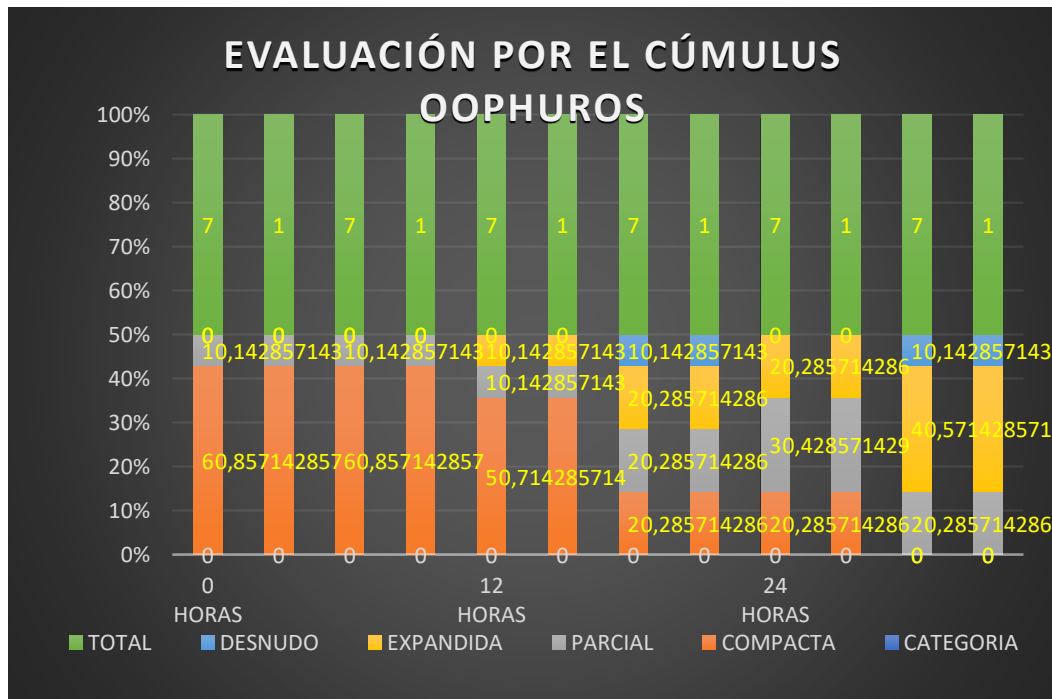


Gráfico 2 Evaluación de los ovocitos a las 0, 12 y 24 horas con relación a su cúmulus oophorus

Elaborado por: Autoría propia

Tabla 8 Evaluación de ovocitos a las 0 horas con relación al citoplasma

Nueva tabla: 03/02/2020 - 0:29:11 - [Versión: 17/11/2016]			
Tablas de contingencia			
<i>Frecuencias: N.º ovocitos</i>			
<i>Frecuencias absolutas</i>			
<i>En columnas: categoría</i>			
HORAS	Tratamientos	Homogéneo	Porcentaje
0 horas	T0	7	50
0 horas	T1	7	50
Total	Total	14	100
Estadístico			
	Valor	gl	p
Chi Cuadrado	0	1	>0,9999
Pearson			
Chi Cuadrado MV-G2	0	1	>0,9999
Coef.Conting. Cramer	0		
Coef.Conting. Pearson	0		

Elaborado por: Autoría propia

La evaluación a las 0 horas tomando en cuenta el citoplasma de los ovocitos, no encontramos diferencia obteniendo así un valor de p de >0,9999 interpretado de la siguiente manera, que los tratamientos a las 0 horas no se encuentra una diferencia porque en los dos tratamientos tenemos la misma cantidad de ovocitos y con las mismas características de citoplasma.

Tabla 9 Evaluación de ovocitos a las 12 horas con relación al citoplasma

 Nueva tabla_1: 03/02/2020 - 0:38:41 - [Versión: 17/11/2016]

Tablas de contingencia

*Frecuencias: N.º ovocitos**Frecuencias absolutas**En columnas: categoría*

HORAS	Tratamiento	Picnótico	Fraccionado	Homogéneo	No homogéneo	Total
12 horas	T0	0	1	4	2	7
12 horas	T1	1	1	5	0	7
Total	TOTAL	1	2	9	2	14

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado	3,11	3	0,3748
Pearson			
Chi Cuadrado MV-G2	4,27	3	0,2337
Coef.Conting.	0,33		
Cramer			
Coef.Conting.	0,43		
Pearson			

 Elaborado por: Autoría propia

En la evaluación a las 12 horas no encontramos una diferencia entre tratamientos obteniendo así un valor de p de 0,3748 interpretando de la siguiente manera que la aplicación de cianocobalamina no tiene efecto sobre el desarrollo de ovocito sin embargo se observa que en el grupo tratamiento tampoco se logra llegar al desnudamiento ya que las dos muestras no se encuentran en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

Tabla 10 Evaluación de ovocitos a las 24 horas con relación al citoplasma

Nueva tabla_2: 03/02/2020 - 1:00:36 - [Versión: 17/11/2016]

Tablas de contingencia

Frecuencias: N.º ovocitos

Frecuencias absolutas

En columnas:

categoría

HORAS	Tratamientos	Picnótico	Fraccionado	Homogéneo	No homogéneo	Total
24 horas	T0	3	1	2	1	7
24 horas	T1	3	1	0	3	7
Total	TOTAL	6	2	2	4	14

Estadístico	Valor	gl	P
Chi Cuadrado	3,00	3	0,3916
Pearson			
Chi Cuadrado	3,82	3	0,2817
MV-G2			
Coef.Conting.	0,33		
Cramer			
Coef.Conting.	0,42		
Pearson			

Elaborado por: Autoría propia

En la evaluación a las 24 horas no se encontró diferencia alguna entre los tratamientos, obteniendo un valor de p de 0,3916, y así obteniendo como un resultado final que los ovocitos tanto del grupo control como del grupo tratamiento al no estar bajo las condiciones adecuadas de temperatura y humedad llegan a morir y la cianocobalamina a las 24 horas llega a hacer tóxica en estas condiciones.

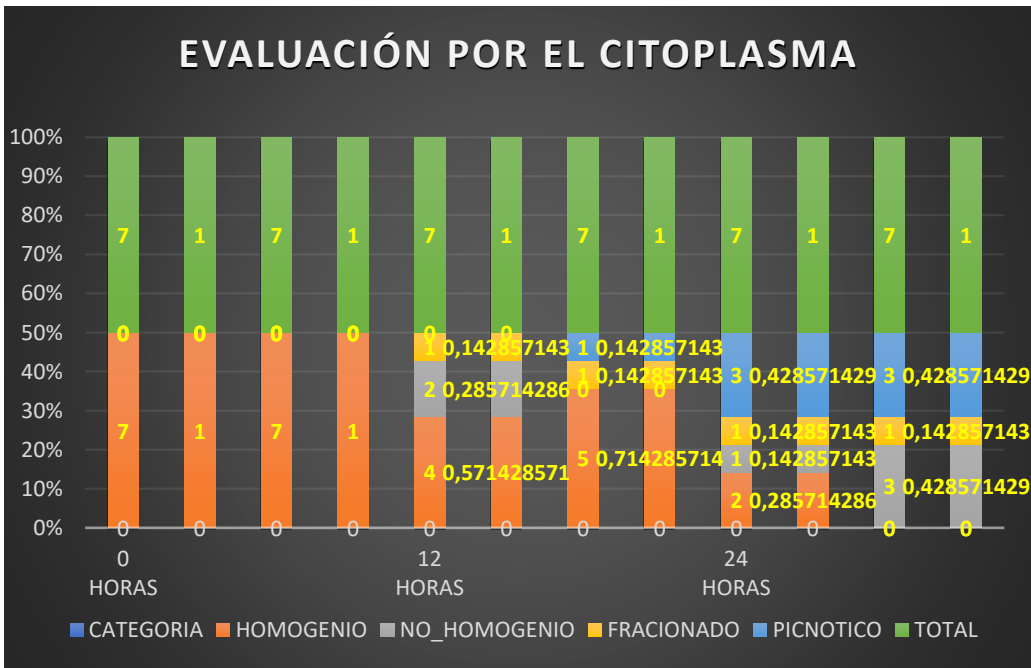


Gráfico 3 Evaluación de los ovocitos a las 0, 12 y 24 horas con relación al citoplasma

Elaborado por: Autoría propia

11.1 DISCUSIÓN

11.1.1 Rendimiento de ovarios vs número de ovocitos

En el rendimiento de ovarios vs ovocitos si encontramos una diferencia por lo que tenemos un valor de p de <0,0001 lo que se interpreta que logramos una mayor cantidad de ovocitos recuperados con relación al número de ovarios recolectados, logrando un total de 160 ovocitos de 60 ovarios colectados.

En el trabajo de Maestría de la Universidad nacional del Antiplano en el estudio realizado sobre la colección cultivo y maduración de ovocitos de vaconas Boss taurus en el Antiplano boliviano se plantea dentro de los resultados que en un total de 138 ovarios se obtuvo un total de 497 ovocitos teniendo un promedio de 7 ovocitos por ovario (27), mientras que en el artículo que lleva por tema capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos bovinos recuperados vía ultrasonográfica y de ovarios de matadero manifiesta en sus resultados que ha logrado recuperar un total de 2049 ovocitos en 18 repeticiones de colecta provenientes de 408 ovarios de 204 vacas beneficiadas por ende el promedio fue de 10 ovocitos por hembra, lo que a su vez no marca una gran diferencia con el resultado obtenido en el presente estudio investigativo que se logra un resultado de la recolección de 60 ovarios de vacas faenadas un

total de 160 ovocitos, con un promedio de 3 ovocitos por ovario, lo que le da una diferencia mayor al trabajo citado ya que ellos logran conseguir dos ovocitos más por ovario.

11.1.2 Efecto de la cianocobalamina a las 12 horas en relación al cúmulo oophorus

A la evaluación de las 12 horas no se encuentra diferencia alguna por lo que obtenemos un valor de p de 0,399 lo que se interpreta de la siguiente manera; que entre los tratamientos T0 como testigo y T1 como tratamiento experimental no hay una variabilidad significativa al momento de usar la cianocobalamina como precursor de desarrollo de los ovocitos in vitro.

No se encuentran estudios publicados en base a la adición de la cianocobalamina como precursor en el desarrollo de ovocitos in vitro por lo tanto para esta discusión se tomará artículos donde se utilice la cianocobalamina (catosal B12), in vivo dentro de estos tenemos:

Cómo mejorar con el uso de catosal B12 los índices reproductivos de las vacas con desordenes ováricos, en donde la unidad experimental fue un total de 40 vacas divididas en dos grupos en el cual el primer grupo fue tratada con GnRh teniendo un efecto en donde el 75% las vacas estaban preñadas, mientras que el segundo grupo tratadas con cianocobalamina (catosal B12) y GnRh ayudo a incrementar la capacidad de fertilización en los animales tratados en un 20-35% llegando a un total del 95% (63). En un siguiente estudio que habla del **efecto de la catosal B12 en vacas lecheras y su relación con la actividad ovárica** donde la unidad experimental fue de 20 vacas divididas en dos grupos, en el grupo tratamiento se le aplico el programa catosal B12 3x4 R12 que consiste en 3 aplicaciones de 20ml con un intervalo de 4 días entre aplicación así como una revisión tocológica a los 12 días posteriores reflejando un resultado que los animales tratados con cianocobalamina (catosal B12) presentaron una elevación significativa en la concentración de estrógeno, mejoraron los niveles de insulina y se redujo el perfil hepático de transaminasas, todas las vacas presentaron celo como respuesta al protocolo de sincronización seleccionado dependiendo de las estructuras ováricas diagnosticas a la palpación rectal a los doce días de iniciado el tratamiento con catosal B12 (64).

12. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)

Esta investigación genera nuevos temas para seguir un estudio que permita establecer mejoras en los medios de maduración y o desarrollo de ovocitos con las condiciones adecuadas como la temperatura, humedad y gases.

Este estudio deja otras puertas abiertas que permitirá a que otros investigadores con intereses por el tema de recuperación de ovocitos y fecundación in vitro puedan llegar proponer nuevos

temas en relación con el estudiado, y de esta manera llegar a contribuir por parte de la practica hacia nuevos conocimientos que llegaran a afirmar teorías.

13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

13.1 CONCLUSIONES

- El rendimiento de los ovarios vs los ovocitos obtenidos es favorable ya que como estipula la literatura se puede conseguir de cada ovario una media de entre 6 a 8 ovocitos por lo cual se mantuvo dentro de los rangos, siendo un aspecto favorable para el estudio.
- La calidad de los ovocitos con la adición de cianocobalamina y los ovocitos del grupo control, no mostró una notable diferenciación.
- Al evaluar el efecto de la cianocobalamina a las cero, 12 y 24 horas sobre la calidad de los ovocitos, no se evidenció un efecto marcado que permita afirmar categóricamente que la cianocobalamina ayuda en el desarrollo de los ovocitos.

13.2 RECOMENDACIONES

Una vez realizado el estudio se recomienda tomar en consideración las medidas adecuadas para la repetición de este tipo de investigación ya que en el transcurso del desarrollo de este proyecto se tuvo algunos inconvenientes que no permitieron llevar a cabo el estudio con las condiciones adecuadas para los ovocitos, por lo que se tuvo que recurrir a la realización de este tema con pequeñas modificaciones.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Canterelli I, Vera F. Elección del sexo en mamíferos, Biotecnología de la Reproducción Gustavo P, editor.; 2011.
2. Dr. Haro Oñate Ruben. Fao.org. [Online].; 2003 [cited 2020 01 09. Available from: <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/genetics/documents/Interlaken/countryreports/Ecuador.pdf>.
3. Tribulo H. Manual de biotecnología reproductiva. , Genética bovina; 2008.
4. Barba E M. Evaluación de dos crioprotectores en la congelación de embriones bovinos producidos in vitro, en medios sintéticos. Tesis previa a la obtención del título de Magister en Reproducción animal. Cuenca: Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2016.
5. Nava T. Hector, Fernandez F. Hugo. Aspiración folicular transvaginal. Maracaibo Venezuela.; 2005.
6. Velarde C Nicolás. Recuperación de ovocitos recolectados de vacas criollas post mortem del sur del Perú. 2005 abril-diciembre.
7. Alvarado J M. Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero. Tesis previa a la obtención del título de Magister en Reproducción animal. Cuenca: Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2017.
8. Ongaratto F. L. Control del desarrollo folicular para la obtención de cocs por aspiración guiada por ultrasonografía. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2013.
9. Wattiaux M A. La Función Reproductiva del Ganado Lechero. Madison, WI 53706 USA: Universidad de Wisconsin-Madison, Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera; 2004.
- 10 Parea Fernando, y otros. et al. Tratamiento del anestro postparto con progesterona intravaginal mas el eCG en vacas mestizas tropicales. citado el 2012 May 12..
- 11 Rivera H. Revisión anatómica del aparato reproductor de las vacas. Miniapoles Dairy Cattle Reproduction Conference. 2009.
- 12 Yanguma. Aparato Reproductor de la Hembra Bovina. In Reproducción Bovina.; 2009. p. 54-62.
- 13 Ruiz M, León V, Ruiz H, Yamasaki M, Lau S. Reproducción Animal: Producción in vitro de embriones de vacas sacrificadas. Chiapas: Universidad Autónoma de Chiapas _

- . UNACH; 2015.
- 14 Webb R, Gosden R, Telfer E, Moor R. Factors affecting folliculogenesis in ruminants.
. PUBMET. 1999.
- 15 Wiltbank M.C, Gümen A, Sartory R. Compendio de la reproducción animal de Intervet. 9th
. ed.; 2006-2007.
- 16 Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth capacitation and final maturation in
. cattle. *Theriogenology*. 1997; 47.
- 17 Gigli , I; Russo , A; Agüero , A. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino,
. bovino y camélidos sudamericanos. Sitio Argentino de producción animal. 2006.
- 18 Fernández Á. Dinámica folicular: funcionamiento y regulación. Sitio Argentino de
. producción animal. 2003.
- 19 Palma G. Biotecnología de la reproducción Buenos Aires; 2001.
.
- 20 Wandji S A, Eppig J J, Fortune J E. FSH and growth factors affect the growth and
. endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenol*.
1996; 45.
- 21 Alvarez A, Perez H, De la Cruz T, Quincosa J, Sanchez A. Fisiología Animal Aplicada.
. Medellín: Universidad de Antioquia; 2009.
- 22 P F. Fecundación in- vitro. Alternativas para la mejora genética en bovinos. Cuenca:
. Universidad de Cuenca; 2011.
- 23 Leibfried Rutledge M L, Crister E S, Parrish J J, First N L. In vitro maturation and
. fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1989; 31.
- 24 Avery B, Jorgensen C B, Madison V, Grevet T. Morphological development and sex of
. bovine in vitro-fertilized embryos. *Reprod*. 1992; 32.
- 25 Sirard M A, First R K. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol*
. *Rep*. 1988; 39: p. 229-234.
- 26 Gonzales V. Evaluación de la expansión de las células del cúmulo en la maduración in vitro
. de tres tipos morfológicos de oocitos procedentes de ovarios de vacas de matadero de la
ciudad de Loja, con dos medios de maduración. Loja:, Carrera de Medicina Veterinaria y
Zootécnia; 2012.
- 27 Santa Cruz C. Efecto de tres suplementos macromoléculas (pva, pvp y bsa) sobre la tasa
de maduración. división y desarrollo embrionario in vitro de ovocitos bovinos procedentes

- . de ovarios obtenidos de camal. Lima-Peru; 2012.
- 28 Hincapie J. Memoria técnica de curso de graduación: Preparación de las columnas de percoll. Honduras; 2010.
- 29 Díez C, Muñoz M, Caamaño J N, Gomez E. Producción y criopreservación de embriones in vitro. , Biotecnologías reproductivas y tecnología agroalimentaria; 2010.
- 30 INIA. Aplicación de la producción de embriones en producción animal. ; 2004.
- .
- 31 Garde J, Lopez L, Gallego M. Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal. ; 1996.
- 32 Fernandez F, Hernandez E, Reyes M. Maduración y fertilización in vitro de ovocitos de cerda obtenidas por punción y corte de folículos. Salud Animal. 2010;; p. 78-83.
- 33 S H. Application on in vitro maturation to assisted reproductive technology. Journal of reproduction and Development. 2009;; p. 1-10.
- 34 Herradòn P G, Quintela L A, Becerra J J, Ruibal S, Fernandez M. Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 2007; 15.
- 35 Gardòn, J. Utilizacion de antisuero HY para sexar embriones bovinos en diferentes estadios de desarrollo embrionario obtenidos por fertilizacion in vitro. Universidad de Cordova , Facultad de Veterinaria; 1999.
- 36 Peláez V. Producción in vitro de embriones. 2011.
- .
- 37 Bols, P; Van Soom, A; Ysebaert, M; Vandenheede, J; Kruif, A. Effects of spiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte Effects of spiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte. Theriogenology. 1996; 45: p. 1001-1014.
- 38 K SD. Determinación de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem a varios periodos de tiempo en el Camal Municipal de Tulcán. Tesis de grado previa la obtención del título de Ingeniera en Desarrollo Integral Agropecuario. Tulcán: Universidad Politécnica Estatal del Carchi.
- 39 Zárate O.E. Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos. Tesis para obtener el grado de maestro en Ciencia Animal. Veracruz: Universidad Veracruzana; 2006.
- 40 Gordon I. Laboratory Production of Cattle Embryos. CABI Publishing. 2003.
- .

- 41 Mermillod, P; Dalbiès R; Uzbekova, S, et al. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? *Reprod Domest Anim.* 2008; 43: p. 393-400.
- 42 Quispe, C; Fernández , E; Ancco, E; Oriundo, K; Mellisho, E. Efecto de la raza de la donadora sobre la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal. *ASPRA.* 2015; 5(1): p. 59-62.
- 43 Becaluba F. Factores que afectan la superovulación en bovino. *Especialista en Reproducción.* Argentina; 2007.
- 44 Campabadal C. Efecto de la nutrición sobre la reproducción. Costa Rica: Asociación Americana de Soya-IM Latino América Congreso Lechero San; 2009.
- 45 Gallegos M. Fertilización in vitro de ovocitos bovinos. Tesis previa a la obtención el grado de doctor en ciencias pecuarias. Nueva León México: Universidad Autónoma de Nueva León; 1998.
- 46 Lopez F P, Lima RS, Risolia P, al e. Heat stress induced alteration in bovine oocyte: functional and cellular aspects. *Animal Reproduction.* 2012; 9(1): p. 395-403.
- 47 Ruiz S. Ovum pick up (OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la reproducción. Murcia: Universidad de Murcia, Fisiología Facultad de Veterinaria; 2006.
- 48 Lorenzo P L. Maduración in vitro de oocitos de ganado vacuno. Tesis doctoral. Madrid-España: Universidad Complutense de Madrid; 1992.
- 49 Chen S, Lien Y, Cheg Y, Chen H, Yang Y. Vitrification of mouse oocytes using closet pulled straws achieves a high survival and preserves good patterns of mitotic stinedls, compared with conventional straws open pulled starws and grids. *Human reproduction.* 2001; 16: p. 2350-2356.
- 50 Sato , H; Matsuo , E; Miyamoto, M. Meiotic maturation of bovine oocyte in vitro : improvement of meiotic competence by dibutyryl cycle adenocine 3,5 monophosphate 1. *J. Anim Sci.* 1990; 68: p. 1182-1187.
- 51 Leibfried Rutledge, M L; Critser, E S; First, N. Effects of fetal salf cerum and bovine cerum albumin on iv vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus oocyte complexes. *Biol Reprod.* 1986; 35: p. 850-857.
- 52 Arlotto T, Schwartz J. L, First N. L, Leivfrid M. L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maduration developmen of bovine oocytes. *Theriogenology.* 1996; 45: p. 943-956.
- 53 Younis A I, Brackett B G, Fayrerhosken R A. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.* 198; 23: p. 189-201.

- 54 Hawk H W, Wall R J. Improvet yields of bovine blastocysts from in vitro - produced . oocytes. I selection of oocytes and zygotes. Theriogenology. 1994; 41: p. 1571-1583.
- 55 Lonergan P, Vergo E, Kinis A, Sharif H, Gordon I. The effect of recovery method o the . type of bovine oocytes obtined for IVM. Theriogenology. 1991; 35: p. 231.
- 56 Nagano M K SaT. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitre . developmental. Zygote. ; 14: p. 53-61.
- 57 Segura G, Cortez J, Cayo I. Capacidad de maduración in vitro de ovocitos obtenidos de . folículos de tres tamaños diferentes en bovinos. ASPRA. 2015; 5(1): p. 106-109.
- 58 Kauffold J, Col. The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is . related to follicular diameter. Journal of Reproduction and Development. 2005; 51: p. 325-332.
- 59 Chohan K HA. Effects of reproductive status on in vitro developmental competence of . bovine oocytes. Journal of Veterinary Science. 2003; 4: p. 67-72.
- 60 Al-Amin M, Nahar A, Ali M. Luteinizing Hormone (LH) efects on in vitro nuclear . maturation of bovine oocytes. Asian Journal of Cell Biology. 2007;; p. 50-53.
- 61 Sagirkaya H, & C. Replacement of fetal calf serum with syntetic serum substitute in the in . vitro maturation medium: efects on maturation, fertilization and subsequent development of cattle oocytes in vitro. Turkey Journal of Veterinary and Animal. 2004; 28: p. 779, 784.
- 62 Morera E. ¿Como mejorar con el uso de catosal B12 los indices reproductivos de las vacas . con desordenes ováricos? Centro Amèrica y el Caribe: BAYER, Product Manager Bayer sanidad Animal.
- 63 Ortiz Chavez , Francisco J; Palacios Cortes, Gabriel; Sosa Ferreira, Carlos F; De la Torre, . David. Efecto de Catosal®B12 en vacas lecheras y su relación con la actividad ovarica. MÉXICO: BAYER.
- 64 Brizzi Enzo. StuDocu. [Online].; 2016 [cited 2019 10 10. Available from: . studocu.com/en/document/universidad-juarez-autonoma-de-tabasco/anatomia-topografica/summaries/anatomia-del-aparato-reproductor-de-la-hembra-bovina/5056469/view?shared=u.
- 65 A. C. Reproduccion Bovina. San Jose Universidad Estatal A Distancia_UENED; 1984.
- 66 Kunkle W, E; Sand , S P; Garcés Yépez. Extrategias para el desarrollo exitoso de las . vaquillas de carne. Florida: Universidad de Florida, Florida Cooperative Extensión Servise; 2002.

15. ANEXOS

15.1 Imágenes

Fotografía 1Recolección de ovarios camal de salcedo



Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 2 Recolección de ovarios en el camal metropolitano de quito



Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 3 Recolección de los ovarios de animales faenados



Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 4 Preparación de medios de lavado y desarrollo de ovocitos para la estabilización de gases



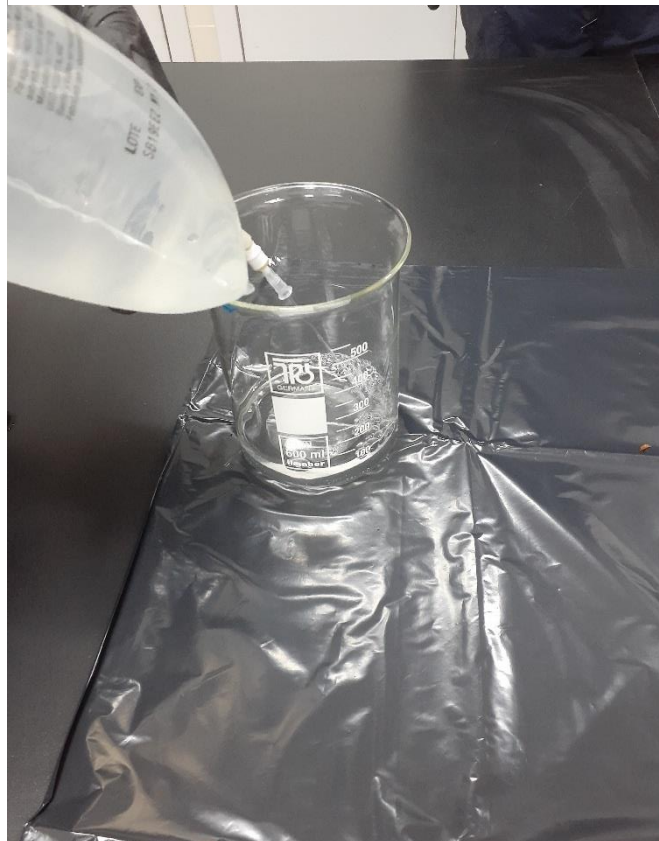
Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 5 Estabilización de gases de los medios de lavado y mantenimiento de ovocitos



Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 6 Preparación del medio de lavado de ovarios



Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 7 Conteo de ovarios para la aspiración de los folículos



Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 8 Lavado de ovarios para la eliminación de restos de sangre



Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 9 Acompañamiento del tutor durante la realización de la parte práctica del proyecto de investigación



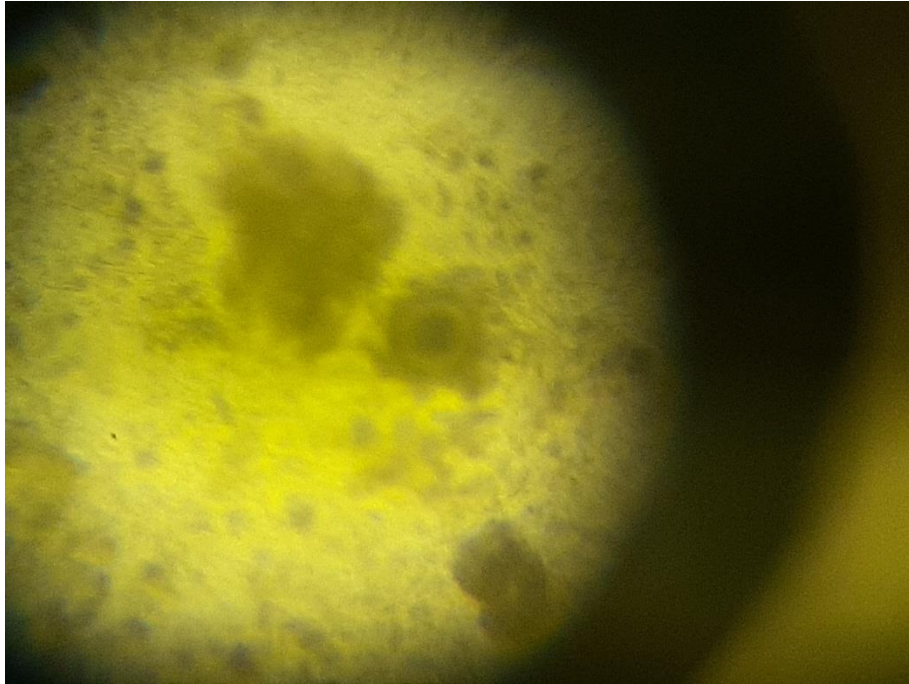
Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 10 Evaluación de ovocitos para la selección y categorización



Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 11 Recuperación, selección y categorización de los ovocitos



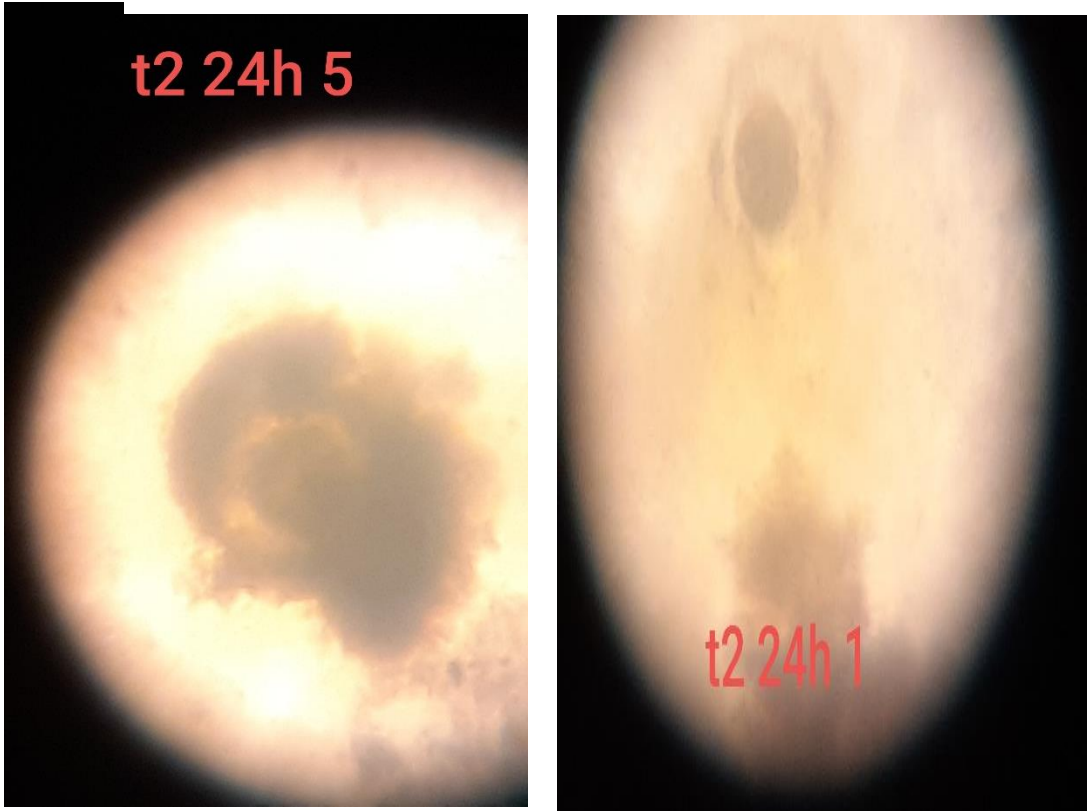
Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 12 evaluación del grupo tratamiento a las 12 horas



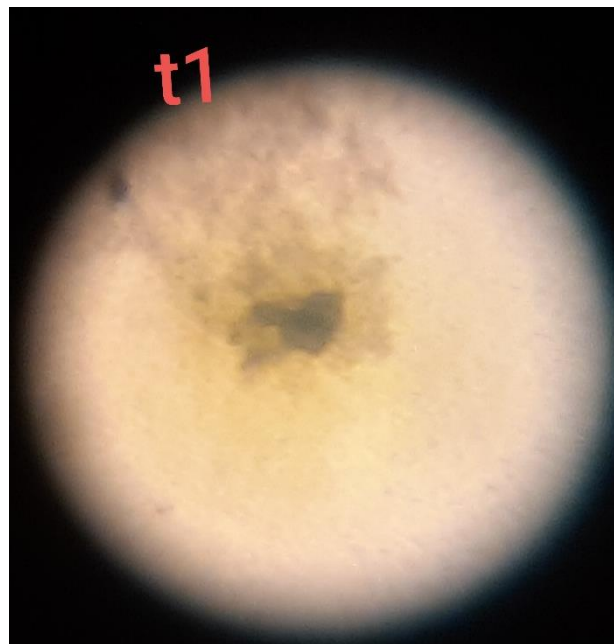
Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 13 Evaluación del grupo tratamiento a las 24 horas



Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 14 Evaluación del grupo control a las 12 horas



Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Fotografía 15 Evaluación del grupo control a las 24 horas



Fuente: realizado por Vanessa Andrade

Tabla 11 Ficha técnica

Registro ICA No. 003-DB		Vida Útil: 60 Meses	Fabricante: KVP - Alemania
Presentaciones de Venta:	Caja x 1 Frasco de 50 - 100 y 250 ml		
Concepto Toxicológico: No Aplica		Licencia Ambiental: No Aplica	
Composición garantizada:	Composición garantizada: Cada mL contiene: Acido 1-(N-butilamino) -1metiletil-fosfónicoButafosfan..... 100mg VitaminaB12.....0,05mg Excipientesc.s. p 1 mL Cada mL contiene: 0,0173 g de Fósforo		
Descripción del producto:	Los compuestos de fósforo, tal como se presentan en Catosal al 10% con vitamina B12 influyen sobre casi todos los procesos de asimilación del organismo, por ello se les ha denominado asimilatorios; así mismo intervienen en un sin número de reacciones enzimáticas. Por su contenido de vitamina B12, Catosal fomenta el metabolismo de los carbohidratos y lípidos, de tal forma que influye favorablemente en el crecimiento corporal, en la formación de glóbulos rojos, y demuestra también una acción protectora del hígado.		

<p>Indicaciones:</p>	<p>Catosal al 10% con vitamina B12 está indicado como coadyuvante en:</p> <p>Enfermedades agudas y trastornos metabólicos agudos como:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Parresias, inapetencia, disminución del rendimiento lácteo, acetonemia, etc. • Agotamiento (p. ej.: después de un parto laborioso). • Debilidad vital y enfermedades de los recién nacidos. • Lumbago del caballo. • Auxiliar en la calcio terapia (p. ej.: en caso de tetania o hipocalcemia). • Intoxicaciones (como coadyuvante). <p>Enfermedades crónicas y trastornos metabólicos crónicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Trastornos del desarrollo de los animales jóvenes causados por enfermedades del crecimiento. • Estados de debilidad en pequeñas especies como perros y gatos, mantenidos en condiciones no fisiológicas. • Canibalismo en aves. • Histeria de las aves.
-----------------------------	---

<p>Indicaciones:</p>	<p>Trastornos metabólicos generales de los animales doméstico scausados por alimentación inadecuada:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Trastornos en los bovinos, durante épocas de sequía, antes de las lluvias, caracterizados por los siguientes síntomas clínicos: parresia, inapetencia, indigestión crónica o sobrecarga del rumen, desnutrición, disminución del rendimiento lácteo. <p>Infertilidad:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Coadyuvante de enfermedades puerperales con los consecuentes trastornos de la fertilidad, se recomienda aplicar 20 mL en la 6° y 4° semana antes del parto, con ello también se reducen los problemas metabólicos como cetosis, fiebre de leche y desplazamiento del abomaso. <p>Anemia:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Secundaria o verminosa. <p>Coadyuvante metabólico:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Al destete de terneros y corderos. • Para vacas lecheras sometidas al esfuerzo intenso de la lactancia. • Para mejorar el estado general de los animales. • Para preparar animales a intervenir en exposiciones. 														
<p>Dosificación:</p>	<p>Para animales sanos: la mitad de la dosis expuesta anteriormente, y en caso necesario, repetirla con intervalos de 1 a 2 semanas.</p> <table border="1" data-bbox="466 1574 940 2056"> <thead> <tr> <th>ESPECIE</th> <th>DOSIS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>EQUINOS</td> <td>Y</td> </tr> <tr> <td>BOVINOS</td> <td></td> </tr> <tr> <td>ADULTOS</td> <td>10 a 25 ml</td> </tr> <tr> <td>POTROS</td> <td>Y</td> </tr> <tr> <td>TERNEROS</td> <td>5 a 12 ml</td> </tr> <tr> <td>OVINOS</td> <td>Y</td> </tr> </tbody> </table>	ESPECIE	DOSIS	EQUINOS	Y	BOVINOS		ADULTOS	10 a 25 ml	POTROS	Y	TERNEROS	5 a 12 ml	OVINOS	Y
ESPECIE	DOSIS														
EQUINOS	Y														
BOVINOS															
ADULTOS	10 a 25 ml														
POTROS	Y														
TERNEROS	5 a 12 ml														
OVINOS	Y														

	<p>CAPRINOS</p> <p>ADULTOS 2,5 a 5 ml</p> <p>CORDEROS Y</p> <p>CABRITOS 1,5 a 2,5 ml</p> <p>CERDOS</p> <p>SEUN SU PESO 2,5 a 10 ml</p> <p>LECHONES 1 a 2,5 ml</p> <p>PERROS</p> <p>SEGÚN SU</p> <p>TAMAÑO 0,5 a 5 ml</p> <p>GATOS Y AVES 0,5 a 1 ml</p> <p>AVES 1 ml</p>	
Vía de administración	<p>Catosal al 10% con vitamina B12 puede inyectarse por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.</p> <p>Puede mezclarse con suero glucosado o soluciones de calcio.</p> <p>Evite contaminación, extraiga el líquido asépticamente.</p>	
Contraindicaciones:	No se han reportado efectos teratogénicos o similares.	
Información complementaria:	En el tratamiento de enfermedades crónicas, como coadyuvante se ha demostrado que Catosal al 10% con vitamina B12 proporciona grandes ventajas en cuanto a la reducción del período de recuperación de los animales tratados.	
Precauciones:	<p>Consulte al Médico Veterinario.</p> <p>Mantener fuera del alcance de los niños.</p>	

	Venta bajo prescripción / receta del Médico Veterinario.
Condiciones de almacenamiento:	Conservar entre 15°C-30°C. Protegido de la luz solar. No congelar.

15.3 HOJA DE VIDA DEL TUTOR

ANEXO N.º 2

CURRICULUM VITAE



DATOS PERSONALES:

NOMBRES:	FABIÁN MANUEL
APELLIDOS:	GUERRERO PAREDES
CÉDULA DE IDENTIDAD:	180390905 - 8
ESTADO CIVIL.	SOLTERO
NACIONALIDAD:	ECUATORIANA
DIRECCIÓN – DOMICILIO:	
PROVINCIA	TUNGURAHUA
CANTÓN:	AMBATO
PARROQUIA:	SANTA ROSA
SECTOR:	YACULOMA
CALLES:	VÍA A SAN PABLO (Principal)
TELÉFONO DOMICILIO:	032474096
TELEFONO CELULAR:	0992480853
CORREO ELECTRÓNICO:	fguerreroregion3@gmail.com fguerreroparedes@yahoo.com

INSTRUCCIÓN:

PRIMARIA: ESCUELA GONZALES SUÁREZ

SECUNDARIO: COLEGIO “FAUSTO MOLINA”

SUPERIOR:

TERCER NIVEL UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

CUARTO NIVEL UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

TITULOS OBTENIDOS

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOOTECNISTA POR: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

MESTRE EN CIENCIAS BIOTECNOLOGIA POR: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

CURSOS REALIZADOS:

- ASISTENTE A LAS PRIMERAS Y SEGUNDAS JORNADAS VETERINARIAS EN LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI (UTC – COLEGIO DE VETERINARIOS DE COTOPAXI).
- PRIMER ENCUENTRO POR LA SALUD ANIMAL (UTC).
- SEMINARIO DE RAZAS Y MANEJO PRODUCTIVO DE UN HATO GANADERO (GRUPO LATINO).
- QUINTO SEMINARIO INTERNACIONAL DE BUIATRÍA (AEB –USFQ - UTPL)
- SEMINARIO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (UTC).
- SEMINARIO DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (UTC).
- SEMINARIO DE CIRUGIA EN GRANDES ESPECIES (PREÑAR EUROGENETICA-CALI-COLOMBIA) (2014)
- SEMINARIO DE GINECOLOGIA Y ECOGRAFIA (PREÑAR EUROGENETICA-CALI-COLOMBIA)
- SEMINARIO DE CIRUGIA EN GRANDES ESPECIES (PREÑAR EUROGENETICA-CALI-COLOMBIA) (2015)
- FORMACION EN BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION (UFPEL-R. G DO SUL-BRASIL 2016)

IDIOMAS:

INGLÉS

PORTUGUES

INFORMÁTICA:

Conocimientos

- Windows
- Procesadores de Texto: Microsoft Word

- Hojas de Cálculo: Excel.
- Hojas de Presentaciones: Power Point
- Internet

EXPERIENCIA

- Práctica Pre- profesionales: CEYPSA – Centro Experimental y Producción Salache – Universidad Técnica de Cotopaxi (6 meses).
- Práctica Pre- profesionales: Granja “María Elena” Santo Domingo de los Tsáchilas. (2 meses).
- Médico Veterinario Particular (4años).
- Médico Veterinario en el Centro Agrícola Cantonal Ambato (2años).
- Médico Veterinario Agrocalidad Pastaza (7meses)
- Investigador en el Núcleo de Pesquisa Ensino e Extensao em Pecuaria (NUPEEC-UFPEL-R. G DO SUL –BRASIL (2 años)
- Misión de estudios en LabRumen-UFSM- R.G Do SUL-Brasil (6meses).
- Apoyo en Docencia en las disciplinas de Clínica de grandes animales, Fisiología de Reproducción en la UFPEL-R. G do SUL-BRASIL (15 meses).

REFERENCIAS:

- Dra. Marisol Álvarez, Teléfono: 0987635804, Ambato – Ecuador.
- Ing. Mauro Guzmán, Teléfono:0996998483, Gerente CEMEAG–Ambato –Ecuador
- Marcio Nunes Corrêa, Teléfono: 53999839408, director NUPEEC-UFPEL-Rio Grande del Sur-Brasil.

15.4 HOJA DE VIDA DEL AUTOR

ANEXO N.º 1

Hoja de vida

DATOS PERSONALES:

APELLIDOS : Andrade Males
 NOMBRES : Vannessa Belén
 FECHA DE NACIMIENTO : 17 de abril 1993
 EDAD : 26 años
 TIPO DE SANGRE : O Positivo
 ESTADO CIVIL : Casada
 CARGAS FAMILIARES : Una
 NACIONALIDAD : Ecuatoriana
 DOMICILIO ACTUAL : Quito, barrio Santa Rita
 TELEFONO CELULAR : 0998279251
 CEDULA : 1723622559
 CORREO : vannessa.andrade9@utc.edu.ec



ESTUDIOS REALIZADOS

Primaria : Escuela Ciudad de San Gabriel.
 Secundaria : Colegio Nacional Experimental “Amazonas”
 Superior : Universidad Técnica de Cotopaxi

TITULOS OBTENIDOS:

BACHILLERATO EN QUIMICO BIOLOGO

REFERENCIAS PERSONALES

FREDDY ANDRADE : 0962557549
 VIVIANA ANDRADE : 0998627281



Universidad
Técnica de
Cotopaxi

CENTRO DE IDIOMAS

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que: La traducción del resumen del proyecto de investigación al Idioma Inglés presentado por la señorita Egresada de la Carrera de **MEDICINA VETERINARIA** de la **FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**, **VANESSA BELÉN ANDRADE MALES**, cuyo título versa “**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CIANOCOBALAMINA SOBRE EL DESARROLLO DE OVOCITOS RECUPERADOS DE OVARIOS BOVINOS POST MORTEM DE CENTROS DE FAENAMIENTO, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**”, lo realizó bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

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

Latacunga, FEBRERO del 2020

Atentamente,

Mg. Nelson Guagchinga

DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS

C.C. 0503246415



**CENTRO
DE IDIOMAS**