

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES.



CARRERA: MEDICINA VETERINARIA

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

TEMA:

EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES EN CUYES (CAVIA PORCELLUS) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

AUTORES:

Ricardo Javier Solís Campaña

Paola Nataly Chávez Viteri

DIRECTOR:

Dra. Paola Lascano

LATACUNGA – ECUADOR

2015

AUTORÍA

Nosotros, Ricardo Javier Solís Campaña y Paola Nataly Chávez Viteri, declaramos que el trabajo aquí descrito, la responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis es de nuestra autoría y que no ha sido presentado para ningún grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

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

Ricardo Javier Solís Campaña
C.I. 1804630638
AUTOR

Paola Nataly Chávez Viteri
C.I. 0502789563
AUTOR

AVAL DE APROBACIÓN

DIRECTOR DE TESIS

En calidad de Director de Tesis Titulada **“EVALUACION DE PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES EN CUYES (CAVIA PORCELLUS) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”**. Propuesto por los egresados Ricardo Javier Solís Campaña y Paola Nataly Chávez Viteri, como requisito previo a la obtención del Título de Médico Veterinario Zootecnista, de acuerdo con el Reglamento de Títulos y Grados, considero que el trabajo mencionado reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

Atentamente,

Dra. Paola Jael Lascano Armas
Directora de Tesis

CARTA DE APROBACIÓN

TRIBUNAL DE TESIS

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

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

Dra. Blanca Mercedes Toro Molina
Presidente del Tribunal.

Mvz. Cristian Neptali Arcos Alvarez
Miembro del Tribunal.

Dra. Mg. Patricia Marcela Andrade Aulestia
Opositora del Tribunal

AGRADECIMIENTO

A Dios sobre todas las cosas por la fortaleza y la sabiduría que puso en mí a cada instante para poder superar todo obstáculo que se me presento en el camino y seguir adelante hasta alcanzar mi meta anhelada.

A mis padres por su apoyo incondicional y por el amor e interés demostrados en todos los momentos que conformaron mi vida estudiantil.

A mi hermano por su ejemplo de lucha por alcanzar las metas propuestas en la vida.

.

Por todo el apoyo y amor que me han sabido demostrar mi más eterna gratitud.

Paola Nataly Chávez Viteri

AGRADECIMIENTO

Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme toda su ayuda, ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado. Con todo mi cariño y amor esta tesis se las dedico a ustedes:

Papá: Wilson

Mamá: Martha

Hermanos: Diego y Selena

Ricardo Javier Solís Campaña

DEDICATORIA

Quiero dedicar este proyecto con mucho amor y cariño a tres personas especiales en mi vida.

A mis Padres Juan y Teresa porque fueron mi inspiración permanente para realizar este proyecto por ser un ejemplo de esfuerzo y lucha para cumplir una meta.

A mi hija María Emilia que es ese motor que me inspira cada día a salir adelante y saber que tengo un motivo muy importante porque luchar en este mundo.

Paola Nataly Chávez Viteri

DEDICATORIA

A Dios, verdadera fuente de amor y sabiduría.

A mi padre porque gracias a él sé que la responsabilidad se la debe vivir como un compromiso de dedicación y esfuerzo.

A mi madre, cuyo vivir me ha mostrado que en el camino hacia la meta se necesita de la dulce fortaleza para aceptar las derrotas y del sutil coraje para derribar miedos.

A mi hermano y hermana, el incondicional abrazo que me motiva y recuerda que detrás de cada detalle existe el suficiente alivio para empezar nuevas búsquedas.

A mis familiares, viejos amigos y a quienes recién se sumaron a mi vida para hacerme compañía con sus sonrisas de ánimo

Ricardo Javier Solís Campaña

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este proyecto de tesis, nos corresponde exclusivamente y el patrimonio intelectual del mismo a la “UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”

Ricardo Javier Solís Campaña

Paola Nataly Chávez Viteri

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
AUTORÍA.....	ii
AVAL DE APROBACIÓN DIRECTOR DE TESIS	iii
CARTA DE APROBACIÓN	iv
AGRADECIMIENTO	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA.....	vii
DEDICATORIA.....	viii
DECLARACIÓN EXPRESA.....	ix
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	x
ÍNDICE DE CUADROS	xiv
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
REVISIÓN LITERARIA	3
1.1 El cuy.....	3
1.2 Anatomía y Fisiología reproductiva del cuy.....	3
1.2.1 Reproducción.....	3
1.2.2 Aparato reproductor de la hembra	4
1.2.3 Aparato reproductor del macho	5
1.2.4 Fisiología de la fecundación.....	7
1.2.4.1 Ovogénesis	7
1.2.4.2 Espermatogénesis	8

1.2.5	Etapas reproductivas	13
1.2.5.1	Pubertad	13
1.2.5.2	Primer celo	13
1.2.5.3	Ciclo estral	13
1.2.5.4	Ovulación y fecundación	16
1.2.6	Factores que impiden la fecundidad	16
1.2.6.1	Consanguinidad	16
1.2.6.2	Alimentación	16
1.2.6.3	Coito Infecundo	17
1.2.6.4	Frigidez de la hembra	17
1.2.6.5	Pseudo preñez.....	17
1.2.7	Problemas reproductivos en la hembra	17
1.2.7.1.	Complicaciones antes de la preñez	18
1.2.8	Problemas reproductivos en el macho	18
1.2.9	Metodología para la obtención y maduración de ovocitos in vitro .	20
1.2.9.1.	Acondicionamiento del material y aspiración de los ovocitos.	20
1.2.9.2.	Lavado y selección de los ovocitos	21
1.2.9.3.	Procedimiento detallado.....	21
1.3	Maduración de ovocitos en microgotas	22
1.4	Metodología de la fecundación in vitro de ovocitos	23
1.4.1	Procedimiento detallado.....	23
1.4.2	Acondicionamiento del semen por centrifugación en gradientes de Percoll:	24
1.4.3	Acondicionamiento del semen utilizando la técnica de Swim up ...	25
1.5	Fecundación en microgotas.....	27
1.6	Metodología para el cultivo in vitro de embriones	29

1.6.1.	Eliminación del exceso de células del cumulus (desempaquete).....	29
1.6.2.	Procedimiento detallado.....	29
1.7	Cultivo de embriones en microgotas.....	30
1.8	Metodologías de uso del medio de cultivo CR1aa y SOF.....	32
1.8.1.	Congelación.....	32
1.8.2.	Descongelación.....	33
1.9	Calidad embrionaria. Códigos de clasificación.....	34
CAPITULO II.....		36
2.1.	Localización.....	36
2.1.1.	Ubicación del ensayo.....	36
2.1.2.	Condición geográfica.....	37
2.2.	Materiales.....	38
2.2.1.	Materiales de oficina.....	38
2.2.2.	Materiales de campo.....	38
2.2.3.	Materiales de laboratorio.....	38
2.2.4.	Materiales Biológicos.....	39
2.3.	Desarrollo metodológico.....	39
2.3.1.	Tipo de investigación.....	39
2.3.1.1.	Investigación Descriptiva.....	39
2.3.2.	Metodología.....	40
2.3.2.1.	Métodos y Técnicas empleadas.....	40
2.3.2.1.1.	Método Inductivo-Deductivo.....	40
2.3.2.1.2.	No Experimental.....	40
2.3.2.1.3.	La Observación.....	41
2.4.	Desarrollo del ensayo.....	42
2.4.1.	Colección de células femeninas (hembras).....	42

2.4.2.	Colección de Células Masculinas (Macho).....	43
2.4.3.	Fertilización de Embriones	44
2.4.4.	Congelamiento y almacenamiento en nitrógeno líquido	45
CAPITULO III		43
3.1.	Número de ovocitos colectados	43
3.2	Clasificación de ovocitos.....	44
3.3	Número de ovocitos maduros y Atrésicos	45
3.4	Número de ovocitos fertilizados	46
3.5	Número de embriones producidos.....	47
3.6	Clasificación embrionaria.....	48
CONCLUSIONES.....		49
RECOMENDACIONES		50
BIBLIOGRAFÍA		51
ANEXOS.....		53

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1	37
CUADRO N° 2 Características Microscópicas De Ovocitos De Hembras	43
CUADRO N° 3 Características Macroscópicas De Semen De Cobayos	44
CUADRO N° 4 Características Microscópicas De Semen De Cobayos Post-Morten.....	44
CUADRO N° 5 Recuperación De Ovocitos	43
CUADRO N° 6 Categorías De Ovocitos Obtenidos	44
CUADRO N° 7 Ovocitos Maduros Y Atrésicos	45
CUADRO N° 8 Número De Ovocitos Fecundados.....	46
CUADRO N° 9 Número De Embriones	47
CUADRO N° 10 Calidad De Embriones	48

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO N° 1 Categorización De Ovocitos.....	44
GRAFICO N° 2 Ovocitos Maduros Y Atresicos	45
GRAFICO N° 3 Número De Ovocitos Fecundados	46
GRAFICO N° 4 Número De Embriones.....	47
GRAFICO N° 5 Calidad De Embriones	48

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Técnica de Cotopaxi desarrollada por la Carrera de Medicina Veterinaria en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción.

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la producción in vitro de embriones de cuyes; determinando la calidad de ovocitos además de los parámetros de calidad de los embriones, mediante la técnica de slicing.

Para el estudio se recolectaron sesenta ovarios procedentes de 30 hembras post-mortem, los cuales fueron colocados en un termo con un medio apropiado para su transporte al laboratorio y posteriormente ser extraídos los ovocitos, esto se realizó por igual al macho para obtener espermatozoides, para que estos por medios controlados sean manipulados y formen embriones in vitro.

La producción in vitro de embriones en cobayos se realizó en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado son: Maduración de ovocitos, Fecundación de ovocitos maduros y Cultivo de embriones. Utilizando una mezcla de gases (nitrógeno 90%, oxígeno 5 % y CO₂ 5%) y una temperatura 38.5°C por 72 horas en baño maría; para obtener ovocitos de buena calidad.

Obteniendo así un resultado 32 embriones de Grado I (excelente calidad), 24 de Grado II de (calidad regular), 10 fueron denominados Grado III (mala calidad) los cuales no se crioconservaron.

ABSTRACT

This research was developed in the installations of the Technical University of Cotopaxi by the career of Veterinary medicine in the Laboratory of reproduction biotechnology.

The main aim of this work was to evaluate in vitro production of guinea pigs' embryos, the quality of their oocytes, and the quality of embryos through the slicing technique.

During the research, sixty ovaries from thirty female post-mortem were collected. They were collected. They were put inside an appropriate thermos for being carried to the laboratory and so on extract the oocytes. Similarly, the male for getting out the spermatozoa. After that, they were involved into a special process to make up in vitro embryos.

The in vitro embryos production was made in three important steps according to the chronological order such as oocyte maturation, fertilization of oocyte, and embryos culture.

Moreover, it was necessary a mixture of gases (nitrogen 90 %, oxygen 5%, and carbon dioxide 5%) and a temperature of 38.5 °C for about seventy two hours in vitro. All of this, with the aim to get oocytes of higher quality.

All in all, the results are spilt in the following way: thirty – two embryos of grade I (excellent quality), twenty-four of grade two II (average quality), and ten named of grade III (bad quality). These last ones can't grow up.

INTRODUCCIÓN

La crianza del cuy es importante por cuanto representa un aporte significativo dentro de la economía campesina, además tiene ventajas comparativas frente a otras especies introducidas, por sus bajos costos de producción y rápido retorno económico. Las ventajas de la crianza de cuyes incluyen su calidad de especie herbívora, su ciclo reproductivo corto, la facilidad de adaptación a diferentes ecosistemas y su alimentación versátil

En nuestro País no se realiza la técnica biotecnológica para la producción *in vitro* de embriones, por lo que estas técnicas ayudaran en la reproducción asistida y para el mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales.

La técnica de fertilización *in vitro* de embriones nos permitirá trasladar toda esta información genética a otros lugares donde los productores la requieran para incrementar los beneficios económicos q están en auge en la actualidad.

Los datos obtenidos mediante esta investigación servirán a los pequeños y grandes productores de cuyes, estudiantes y técnicos como base bibliográfica para que puedan realizar una buena explotación.

El establecimiento de nuevas biotecnológicas para la producción *in vitro* (PIV) de embriones tienen un gran potencial como método de obtención de un elevado número de embriones utilizables, tanto para estudios científicos como para aplicación comercial.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la producción *in vitro* de embriones en cuyes (*cavia porcellus*) mediante la microscopia en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria para establecer una nueva biotecnología reproductiva aplicada a esta especie.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los parámetros de calidad de ovocitos mediante la microscopia para determinar la viabilidad de los mismos.
- Realizar maduración de ovocitos y espermatozoides mediante su capacitación para la fertilización in vitro.
- Determinar la calidad de embriones mediante la microscopia para su viabilidad.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS ALTERNATIVA

Hi.- Se logrará fertilizar in vitro embriones de cuyes con material de animales sacrificados.

HIPÓTESIS NULA

H0.- No se logrará fertilizar in vitro embriones de cuyes con material de animales sacrificados.

CAPÍTULO I

REVISIÓN LITERARIA

1.1 El cuy

Cavia porcellus es una especie de roedor histricomorfo de la familia Caviidae originaria de la región andina de América del Sur. Alcanza un peso de hasta 1 kg. Vive en áreas abiertas y utiliza hoyos y madrigueras para ocultarse y protegerse. Vive entre 4 y 6 años.

1.2 Anatomía y Fisiología reproductiva del cuy

1.2.1 Reproducción

El cuy es una especie poliéstrica anual; a diferencia de otras especies de roedores, en las que el parto se realiza en un estado casi fetal de desarrollo de las crías, en el cuy las crías nacen con desarrollo físico y fisiológico completo y los ojos abiertos. Las crías inician la alimentación inmediatamente, con poca dependencia de la madre. (4)

1.2.2 Aparato reproductor de la hembra

- **El aparato reproductor de la hembra está conformado por:**

1. Los ovarios

Son órganos ovoides intraabdominales, recubiertos por una membrana serosa o bolsas ováricas, miden de 0.3-0.6cm X 0.2-0.4cm, pesan 0,033g están ubicados en la parte craneal de los cuernos uterinos (1)

Cada ovario esta irrigado por vasos sanguíneos provenientes de la arteria ovárica y la arteria uterina, redes de vasos linfáticos y nervios simpáticos y parasimpáticos. (1)

Los ovarios en las hembras están en una etapa dinámica que se inicia en la pubertad y continua durante todos los ciclos reproductivos. (3)

2. Los oviductos

También son llamadas trompas uterinas, son dos tubos flexuosos que establecen comunicación entre los ovarios y el útero, el oviducto se divide en tres partes: el infundíbulo, ampolla e istmo. La función de estos es transporta el ovulo hasta el cuerno uterino, es aquí en donde se realiza la fecundación de los óvulos. (2)

3. El útero

La hembra de esta especie presenta útero bicorne, en forma de V. Los cuernos uterinos miden de ancho en su parte media 6mm y de longitud 37mm, tanto el cuerno uterino como el cuerpo del útero, se encuentran sostenidos por el ligamento ancho, el cual fija la pared sublumbar de la cavidad abdominal y al borde anterior de la cavidad pélvica.

Las paredes internas de los cuernos uterinos están revestidos por la mucosa llamada endometrio que es la encargada de secretar sustancias nutritivas para

alimentar al huevo o cigoto hasta que se transforme en feto. El cuerpo uterino mide 7mm de ancho y 13mm de largo (1)

4. La vagina

Es un tubo de músculo fibroelástico, su longitud es de 3cm X 1cm de ancho, se encuentra ubicado en la cavidad pelviana. La pared interna presenta un pliegue transversal dorsal y dos longitudinales. Su función es la recepción del pene del macho durante la cópula y el pasaje del feto durante el parto. (3)

5. La vulva

Es la abertura en forma de V o Y que se ve en la parte externa de la hembra. En su porción ventral presenta una escotadura que forma dos pequeños labios en cuyo fondo se halla el meato urinario. En posición dorsal presenta el clítoris. (2)

1.2.3 Aparato reproductor del macho

El aparato reproductor del macho está formado por:

1. Los testículos

Está ubicado en la cavidad abdominal a ambos lados de la vejiga, su forma es ovoide, miden 22mm de largo X 18mm de ancho y su peso va desde 2.5- 4g. Lo característico de los cuyes es la falta de escroto.

Cuando el macho se excita, los testículos descienden a la región inguinal, a un saco, en este saco ciego se encuentra una porción del musculo cremaster que es el que permite la migración de los testículos a la región abdominal.

Los testículos presentan: la túnica albugínea en la cual se encuentran los túbulos seminíferos encargados de producir los espermatozoides. Entre los túbulos se encuentran diseminadas las células de Leydig que producen las hormonas de la reproducción. Además, se encuentran las células de Sertoli que se encargan de

alimentar a los espermatozoides hasta la madurez. Luego la llamada red de Testi o mediastino del cual salen los conductos deferentes que llegan al epidídimo (b)

2. El epidídimo

Es un conducto sinuoso que tiene las siguientes partes: cabeza, cuerpo y cola, su función es el transporte, maduración y concentración de espermatozoides. De la cola del epidídimo continua el conducto deferente. Los conductos deferentes junto con las glándulas vesicales, desembocan en la uretra pélvica. (a)

3. Glándulas vesicales

Son dos glándulas alargadas, tienen 12cm de largo y 6mm de diámetro en su parte media. La parte líquida del semen es proporcionada por las vesículas seminales. (b)

4. Próstata

Es de forma lobular y mide 19mm de largo y 9mm de ancho. (a)

5. Glándulas bulbo uretrales

Tienen forma de arveja y segregan la sustancia mucilaginosa. (c)

6. Pene

Órgano copulador del macho, sus medidas son 4cm de longitud y 5mm de diámetro. El glande presenta forma de cono truncado con un orificio en la parte ventral que es el orificio uretral (a)

1.2.4 Fisiología de la fecundación

1.2.4.1 Ovogénesis

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

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

Antes de sufrir la meiosis, las células germinales replican su ADN y contienen en ese momento cuatro copias de ADN y un número $2n$ de cromosomas, como cualquier célula diploide; mientras que entre las dos divisiones meióticas la replicación de ADN queda suprimido, lo que asegura que los gametos resultantes sean haploides. (5)

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

En las hembras, toda la población de ovocitos entra en meiosis sincrónicamente en la vida fetal. La primera división meiótica progresa hasta que el ovocito alcanza el estadio de diplotene difuso de la profase I (estado dictiatio), donde se produce la primera detención de la meiosis, justo antes o poco después del nacimiento. A

partir de este momento, el ovocito comienza a ser rodeado por células pregranulosas, las cuales forman una membrana basal alrededor de ellas, quedando formado el compartimento folicular. La primera parada de la meiosis se mantiene hasta momentos antes de la ovulación o de la atresia folicular (Tsafririet al., 1983), y es importante para asegurar que el ovocito disponga de tiempo suficiente para crecer antes de la fecundación, de modo que sea capaz de mantener el proceso de la embriogénesis. (6)

En este estadio, los ovocitos se caracterizan por tener un núcleo prominente, denominado vesícula germinal (VG) (Franchi et al., 1962), y por estar rodeados por una capa de células epiteliales (foliculares), lisas no proliferativas, conocidas como células pregranulosas, que ejercen un efecto inhibitor sobre la meiosis y el crecimiento folicular.

En el momento del nacimiento, la mayoría de los ovocitos han alcanzado este estadio y se encuentran formando los folículos primordiales, siendo la única fuente de gametos femeninos en el animal sexualmente maduro. (5)

1.2.4.2 Espermatogénesis

La meiosis es un tipo de división celular especializada presente en todos los organismos eucariotas con reproducción sexual, desde las levaduras hasta los mamíferos. Mientras que en las levaduras se da en respuesta a una carencia de nutrientes, y su producto constituye la fase haploide de su ciclo de vida, en los eucariotas superiores, que se reproducen sexualmente, ocurre dentro del proceso de formación de gametos, o gametogénesis. La espermatogénesis, en particular, es un complejo proceso que conduce a la formación de gametos masculinos en las gónadas correspondientes, y puede subdividirse en tres grandes etapas:

- a. Proliferación mitótica de las espermatogonias
- b. Divisiones meióticas de los espermatocitos, y
- c. Espermiogénesis

Considerando los organismos diplontes, a diferencia de la mitosis, que tiene lugar en todas las células somáticas, la meiosis ocurre únicamente en las células de la línea germinal y consiste en dos divisiones celulares consecutivas, precedidas de una única duplicación del material genético. (5)

Mientras la primera división meiótica es reduccional y presenta características únicas, la segunda es ecuacional y se asemeja a una mitosis. Como resultado de ambas divisiones se obtienen cuatro células haploides, con un único juego de cromosomas, que se diferenciarán dando lugar a los gametos. La meiosis, por lo tanto, permite el mantenimiento del número cromosómico de la especie, que es restablecido al fusionarse los gametos masculino y femenino durante la fecundación con la formación del cigoto (6)

Además de la evidente importancia de su carácter reduccional, durante la meiosis ocurren importantes reordenamientos de la información genética a través de la recombinación homóloga, mediados por procesos de ruptura y reunión que conducen al intercambio recíproco de material entre cromátidas homólogas.

La primera división meiótica es única por mantener asociadas las cromátidas hermanas a nivel de sus centrómeros, mientras que los cromosomas homólogos se comportan coordinadamente, migrando a polos opuestos. Esta coordinación en el comportamiento cromosómico depende de complejos procesos y elaboradas estructuras, que vienen siendo estudiadas con gran interés.

Durante la segunda división meiótica las cromátidas hermanas pierden sus conexiones centroméricas y segregan a polos opuestos.

La meiosis I se caracteriza por una extensa profase que ha sido subdividida en cinco estadios para facilitar su descripción. Durante el primero de dichos estadios, leptoteno (L), se organiza un eje de naturaleza proteica a lo largo de cada cromosoma, de forma previa al apareamiento de los cromosomas homólogos. A estos ejes se les conoce como ejes cromosómicos simples o elementos axiales (EAs). La cromatina se encuentra dispuesta como finos filamentos, que en muchas

especies es imposible identificar como cromosomas individuales. Es también durante leptoteno (L) que los extremos teloméricos insertos a nivel de la periferia nuclear se mueven en el plano de la envoltura nuclear, comenzando a agruparse. (b)

En la transición al estadio siguiente, el cigoteno (Z), los telómeros llegan a agruparse en un sector limitado de la envoltura nuclear, lo cual conduce a una peculiar conformación cromosómica que recuerda a un arreglo floral, y que se ha denominado bouquet. Ha sido sugerido que esta disposición peculiar de los telómeros durante la profase facilitaría el reconocimiento cromosómico y el apareamiento estable de los homólogos, ya que es durante el cigoteno (Z) que los cromosomas homólogos comienzan a aparearse (sinapsis homóloga), y los elementos axiales (EAs) pasan a constituir, en tramos de longitud creciente, los elementos laterales (ELs) de estructuras más complejas: los complejos sinaptonémicos (CSs); Los complejos sinaptonémicos CSs son complejos macroproteicos específicos de la meiosis que al microscopio electrónico (ME) de transmisión se observan como estructuras tripartitas integradas por dos elementos laterales y un elemento central o medial (EM).

Los ELs y el EM se mantienen unidos por finas fibras denominadas filamentos transversos. En los estadios de L y Z pueden observarse, como primer signo citológico del proceso de recombinación, complejos proteicos conocidos como nódulos de recombinación tempranos que marcarían todos los sitios donde ocurren reacciones relacionadas con el intercambio de hebras. En la siguiente etapa, paquiteno (P), los cromosomas se encuentran totalmente sinapsados de un extremo a otro, lucen más cortos y gruesos, y la configuración en bouquet comienza a desarmarse. (a)

Es durante este estadio que tiene lugar la recombinación homóloga o crossingover, que aparece también mediada por los CSs, y que conduce al intercambio recíproco de material entre las cromátidas homólogas apareadas, como se mencionó anteriormente. Los nódulos de recombinación tardíos pueden

observarse durante P, y son menores en número a los nódulos tempranos detectados en L/Z, ya que se corresponden con aquellos intercambios que son efectivamente resueltos como cross-overs. (c)

La recombinación homóloga representa una importante fuente de variabilidad genética, y por lo tanto, de biodiversidad, por las siguientes razones:

- a. Genera el intercambio de fragmentos génicos de origen paterno y materno;
- b. Incorpora durante el proceso posibles errores o modificaciones;
- c. Es cuantitativamente importante, dado que necesariamente existirá al menos un punto de recombinación (usualmente varios) por cromosoma (la ocurrencia de al menos un evento de crossingover por par cromosómico resulta crucial para una correcta segregación de homólogos durante la metafase I y, la no ocurrencia, de aneuploidías);
- d. Es trascendente, dado que al producirse en los gametos, de ser éstos viables transmitirán la modificación génica a la descendencia y, a través de ella, a la población y a la especie. De este modo, la recombinación constituye, junto a los procesos de mutación y segregación, uno de los principales sustratos de la evolución. Desde un punto de vista genético, el generar nuevas combinaciones de genes ligados y no ligados, es la principal consecuencia de la reproducción sexual.

La recombinación continúa hasta el siguiente estadio, el diploteno (D), durante el cual los CSs se desensamblan y los homólogos comienzan a separarse, al desaparecer las cohesinas que se encontraban uniendo a los homólogos. En esta etapa los cromosomas permanecen, en general, unidos en varios puntos denominados quiasmas, que representarían la evidencia morfológica de los intercambios que tuvieron lugar (sitio de ruptura y reunión recíproca entre cromátidas no hermanas) (5)

En la última etapa, la diacinesis, los centrómeros se separan y los cromosomas se mantienen unidos únicamente por los extremos de las cromátidas.

Los procesos de alineamiento, sinapsis y recombinación que tienen lugar en los meiocitos primarios o meiocitos I (diploides, y con contenido de ADN=4C) durante la profase I, son esenciales ya que aseguran la correcta segregación cromosómica en la primera división meiótica. Su alteración suele tener consecuencias deletéreas para la meiosis pudiendo incluso ocasionar infertilidad (Hunt, 2006). Luego de culminada la profase meiótica I tiene lugar la metafase I, marcada por la migración de los cromosomas hacia la placa ecuatorial. En la anafase I los cromosomas homólogos se segregan, dando lugar, en la telofase I, a dos células hijas denominadas meiocitos secundarios o meiocitos II (haploides, pero con contenido de ADN=2C). Finalmente, la segunda división meiótica lleva a la separación de las cromátidas hermanas obteniéndose, como resultado, cuatro células haploides con contenido de ADN=C, llamadas espermátidas redondas en el proceso de espermatogénesis. (6)

Centrándonos en el proceso de espermatogénesis en mamíferos, la última etapa dentro de este proceso se denomina espermiogénesis

La diferenciación de las espermátidas hacia espermios maduros es un ejemplo clásico de diferenciación terminal, que resulta sumamente interesante dados los cambios morfológicos sufridos durante la misma. (5)

Las espermátidas resultantes de la segunda división meiótica son células redondas que carecen de flagelo. Mediante la espermiogénesis estas células adquieren las estructuras que serán funcionales en lo referente a la motilidad y la interacción con el gameto femenino. Los cambios más relevantes son: (6)

- a. Se genera la vesícula acrosómica a partir del aparato de Golgi;
- b. El acrosoma forma una caperuza sobre la superficie nuclear;
- c. El núcleo rota posicionando al acrosoma hacia la membrana basal y al centríolo hacia la luz del túbulo;
- d. Se comienza a formar el flagelo a partir del centríolo;
- e. El núcleo se aplana;

- f. El material nuclear se condensa;
- g. Se elimina gran parte del citoplasma;
- h. Las mitocondrias forman un anillo en la base del flagelo. Finalmente, los espermatozoides maduros son liberados a la luz de los túbulos seminíferos.

1.2.5 Etapas reproductivas

1.2.5.1 Pubertad

Señala que las hembras bajo condiciones normales de manejo, alcanzan la pubertad entre los 55 y 70 días de edad, pero si la alimentación es de alta calidad esta es a menor edad, ya que se origina un crecimiento acelerado pudiéndose presentar desde los 45 a 60 días, una alimentación inadecuada retarda su aparición, la pubertad se presenta en madres independientemente de la presencia del macho. (1)

Indica que si bien es cierto que las hembras llegan a su madurez sexual cuando tienen de 25 a 40 días, esto no quiere decir que están en la edad óptima para ser cubiertas por cuanto físicamente aún no están desarrolladas y aptas para ser madres, en caso de que esto no hubiese sucedido la cobaya sufrirá un retraso total en su desarrollo y como producto del acoplamiento temprano dará crías completamente pequeñas y raquíticas, susceptibles a enfermedades. (3)

1.2.5.2 Primer celo

Indica que el primer celo en la hembra se presenta, generalmente, después de los 30 días de edad. Bajo condiciones normales de manejo, puede presentarse entre los 55 y 70 días dependiendo de la alimentación recibida, el peso corporal es un parámetro más constante que la edad (2)

1.2.5.3 Ciclo estral

Señala que la duración del ciclo es de 16,4 días con un promedio de ovulación de 3,14 óvulos por ciclo.

El ciclo estral presenta cuatro fases completamente definidas y que son las siguientes: (1)

1) Proestro

En esta fase se puede observar una congestión de los genitales externos, secreción cerosa de la misma y células nucleadas en la mucosa vaginal. El proestro dura 13,9 horas. (2)

2) Estro o celo

Es la fase de celo o calor cuando las hembras aceptan al macho caracterizándose por la presencia de células comificadas en la mucosa de la vagina. Esta etapa dura de 11 a 12 horas, la manifestación de celo en esta especie se presenta también inmediatamente después del parto aproximadamente de 2 a 3 horas, está demostrado que el 74% de hembras paridas presentan el celo postpartum fértil, y tiene una duración de 3,5 horas. (5)

3) Metaestro

Cuando las hembras han pasado su estado de calor o celo y ya no acepta al macho se halla en estado de meta estro, que se caracteriza por la presencia de células epiteliales y leucocitos. En esta fase el útero se prepara para la implantación del huevo fertilizado. Esta fase dura 20.4 horas. (6)

4) Diestro

Es la fase más larga del ciclo, y donde el cuerpo lúteo ha crecido plenamente, hay predominancia de leucocitos. El tiempo que dura esta fase es de 14,7 días. (2)

1.2.5.4 Ovulación y fecundación

La ovulación se produce aproximadamente 10 horas después de haberse iniciado el celo, sin ser ésta inducida por el macho, sino espontánea después de dos a tres horas de concluido el estro. Si no ocurrió la monta, simplemente los óvulos producidos no son fecundados y se expulsan por la vagina más tarde. (6)

Si ha ocurrido la monta, el macho ha depositado el semen que permanece en el tracto genital femenino.

Los espermatozoides han ingresado a la cavidad uterina dos horas antes de la ovulación, tienen alrededor de 13 horas críticas para fecundar los óvulos, que descienden por los oviductos luego de concluido el estro.

También se produce una ovulación en el celo posparto, que ocurre de dos a cuatro horas después de concluido el parto y no dura más de 1.5 horas, luego de las cuales la hembra rechaza al macho. Se trata por tanto de un estro corto en comparación con el estro regular, que dura alrededor de 8 horas. La probabilidad de fecundación de este celo posparto es de 70 al 80%. (5)

1.2.6 Factores que impiden la fecundidad

1.2.6.1 Consanguinidad

No es otra cosa que el apareamiento entre animales emparentados, es decir entre hermanos, por lo tanto a medida que avanza el problema de la consanguinidad los animales tienden a volverse estériles. (c)

1.2.6.2 Alimentación

Factor importante principalmente cuando se supera el 50% de la gestación. Al suministrar una dieta completamente pobre en nutrientes, tanto en la calidad como

en la cantidad, puede ser determinante para que se produzca una reabsorción fetal y por lo tanto no haya el parto respectivo. (b)

1.2.6.3 *Coito Infecundo*

Se produce cuando los animales, tanto machos como hembras han entrado muy prematuramente al empadre; en el caso de los machos su acoplamiento se ha realizado con espermatozoides inmaduros, tiernos o con defectos patológicos. (d)

1.2.6.4 *Frigidez de la hembra*

Se relaciona a que una hembra no puede presentar calores debido al mal funcionamiento del sistema reproductor, por lo tanto, como no hay celo tampoco existirá ovulación y el salto del macho será infructuoso. (b)

1.2.6.5 *Pseudo preñez*

No es otra cosa que una falsa gestación que se observa en las reproductoras y se debe a un hábito que han adquirido los animales como producto de que sus progenitores han tenido idénticas características. (c)

1.2.7 *Problemas reproductivos en la hembra*

Los problemas reproductivos que se dan durante la vida reproductiva de los cuyes hembras pueden acomodarse en cuatro grupos:

1. Antes de la preñez
2. Durante la preñez
3. Durante el parto y
4. Después del parto.

Cuando se refiere a la preñez como tal, pueden producirse pérdidas durante las etapas embrionarias o fetales, que, según el momento de su presentación pueden afectar el ciclo estral. (5)

1.2.7.1. Complicaciones antes de la preñez

1. Quistes ováricos

Su presentación es muy común, pudiendo observarse en hembras preñadas y no preñadas. En algunas ocasiones la presencia de estos quistes se asocia con alopecia, endometritis, hiperplasia endometrial, fibroleiomas y en otros casos hasta es posible observar hematuria intermitente. (4)

1.2.8 Problemas reproductivos en el macho

1. Contaminación del pene

Es la presencia de excremento o cuerpos extraños en la superficie externa del pene, por lo general; estas contaminaciones pasan desapercibidos, por la falta de costumbre del criador de realizar la revisión expuesta del pene antes y después del empadre.

La contaminación del pene se produce generalmente después del servicio, puesto que cuando el macho retira el pene flácido y húmedo, éste roza con las heces de la cama y arrastra excremento dentro del prepucio contaminándose con cualquier cuerpo extraño presente en esa zona.

En la hembra, ocasiona infertilidad, vaginitis, piometra y muerte embrionaria o momificación fetal por la contaminación con las bacterias fecales. (4)

2. Daño del escroto

Esta situación sucede como consecuencia de la acumulación de heces pegoteadas a nivel del “escroto” (los cuyes no tienen un escroto real) que al entrar en contacto con la piel provocan irritación o también por el incremento de testosterona durante el empadre que provoca excitación y relajación de los testículos los cuales descienden al “escroto”, entran en contacto directo con las heces y orina lo que cuarteo y tumefacta. (4)

3. Compactación anal

Es relativamente común en cuyes machos mayores de dos años y es provocado por las retenciones fecales de heces blandas y malolientes. Se piensa que esta acumulación de heces se produce por la pérdida del tono rectal, producido por estrés, enfermedad o falta de coprofagia, lo que facilita su acumulación en el saco o bolsa del recto provocando atrofia y/o deterioro crónico de los músculos que forman este saco y facilitando la acumulación de esta masa pegajosa, lo que posteriormente dificultará la expulsión de las excretas. Los signos que se observan son fuertes olores y estreñimiento. (4)

La fecundación in vitro (FIV) se ha definido como la unión o cocultivo de espermatozoides capacitados y ovocitos maduros de forma que la penetración espermática ocurra fuera del tracto genital femenino (Martínez et al., 1989). La producción in vitro de embriones (PIV) es un proceso más amplio que comprende: la obtención y maduración in vitro (MIV) de los ovocitos, la capacitación in vitro de los espermatozoides, el cocultivo de ambos gametos o FIV, y el cultivo in vitro de los embriones resultantes (CE) hasta alcanzar el estadio de blastocisto. (b)

Aunque se han hecho grandes progresos en el desarrollo de las técnicas de MIV, FIV y CE, aún son necesarias nuevas mejoras para maximizar la producción de embriones. (e)

La utilización de la fecundación *In vitro* para la producción de embriones ha permitido demostrar sus numerosas aplicaciones, entre las que podemos destacar:

Aumentar el rendimiento de los programas de producción de embriones a partir de hembras de elevado valor genético.

Permite producir embriones a muy bajo coste.

Permite obtener descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por su avanzada edad o durante los programas de erradicación de enfermedades infecciosas. (c)

Facilita la utilización de semen sexado.

La producción de embriones *In vitro* es un procedimiento que consta de varias etapas.

Estas etapas pueden resumirse en las siguientes: obtención de ovocitos, selección de los ovocitos, maduración *In vitro* (MIV), fecundación *In vitro* (FIV) y cultivo de los cigotos resultantes hasta blastocistos (CIV). (3)

1.2.9 Metodología para la obtención y maduración de ovocitos in vitro

Día 1:

1.2.9.1. Acondicionamiento del material y aspiración de los ovocitos

Los ovocitos obtenidos a partir de ovarios de animales posmortem, son transportados al laboratorio en termo conteniendo solución fisiológica estéril más el agregado de agentes antimicrobianos a una temperatura de 20-25 °C. A esta temperatura, los ovarios podrán permanecer en el termo hasta aproximadamente 6-7 horas sin afectar significativamente los resultados posteriores. Por esta razón, cuando el transporte deba efectuarse durante un período más prolongado, es conveniente disminuir la temperatura hasta unos 15-16 °C. (b)

Una vez en el laboratorio, los ovarios serán acondicionados, eliminándose los restos de cuerno uterino, oviducto y/o ligamentos y lavados tres veces en solución fisiológica estéril. Posteriormente se procederá a cortar lo más fino posible aplicando la técnica slicing o corte, por el tamaño de los ovarios, procediendo hacer un lavado retrogrado con holdig, en una caja petri. (e)

1.2.9.2. Lavado y selección de los ovocitos

Luego del llenado de cada tubo conteniendo fluido folicular, estos deberán permanecer en reposo durante 10-15 minutos con el propósito de que los complejos cumulus-ovocito descansen y formen un pellet en el fondo del tubo. Luego de ese tiempo, el pellet será recolectado con pipeta Pasteur y colocado sobre una placa de búsqueda. Una alternativa a este último procedimiento sería eliminar el sobrenadante con jeringa o micropipeta (1000 μ l) hasta dejar un volumen de 2-3mL en el fondo del tubo, el cual se homogenizará y se colocará sobre la placa de búsqueda. (b)

Los ovocitos seleccionados serán lavados al menos tres veces mediante el pasaje a través de gotas de medio de maduración (cuadro 2, 3 y 4) sobre placas de petri. El propósito de este lavado, será la eliminación del fluido folicular que vehiculiza los ovocitos, así como también posibles contaminantes provenientes de la sala de punción. Una vez lavados y seleccionados, serán posteriormente colocados en grupos de hasta 45 ovocitos por cada celda, en placas de cultivo, conteniendo 400 μ l del mismo medio en cada celda, y puestos a cultivar en estufa a 38,5°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. (e)

1.2.9.3. Procedimiento detallado

1. Preparar placa de cultivo con 400 μ l de medio de maduración en cada celda.
2. Preparar placa de búsqueda.
3. Preparar pipeta Pasteur (flameada).
4. Preparar pipeta con capilar de vidrio para búsqueda y lavado (flamear el capilar sobre mechero y afinar su extremo).

5. Una vez que se ha concluido la aspiración de los ovocitos, se dejan decantar los ovocitos durante 10-15 minutos. Los ovocitos contenidos en fluido folicular dentro del tubo, serán recuperados mediante al menos dos formas:
6. con pipeta Pasteur, aspirando desde el fondo del tubo o
7. con micropipeta de mil μl , aspirar y descartar el sobrenadante.
8. Una vez recolectados los ovocitos desde la placa de búsqueda, proceder a lavarlos mediante 3-4 pasajes a través de gotas de medio de maduración.
9. Cargar la placa de cultivo con grupos de 45 ovocitos por cada celda.
10. Colocar las placas en estufa durante 20-24 hs, en las condiciones ambientales descritas anteriormente.

1.3 Maduración de ovocitos en microgotas

Una variante a la maduración en placas de cultivo, la constituye el cultivo en microgotas. En este procedimiento se utilizan placas de petri, sobre las cuales se efectúan gotas con el medio de maduración, las cuales se cubren con aceite mineral. (b)

La metodología se realiza del siguiente modo:

- 1) Colocar sobre una placa de petri una gota de medio de maduración (anclaje). El volumen de la misma dependerá del volumen final de la microgota (ej. para un volumen final de 50 μl , un anclaje de 10 μl). La cantidad de ovocitos a colocar por cada gota dependerá también del volumen de la misma, respetándose generalmente, una relación de 2-10 μl de medio por ovocito puesto en cultivo (la relación deberá ser menor, cuanto menor sea el número de ovocitos puestos a madurar en cada gota).(e)
- 2) Luego de efectuar el anclaje, las microgotas se cubren con aceite mineral.
- 3) A través del aceite mineral, completar el volumen final de la microgota.
- 4) Colocar los ovocitos a madurar, dentro de las microgotas y llevar a estufa de cultivo.

La adición de aceite mineral, tiene por objeto, evitar la deshidratación de los medios, ya que a pesar que las estufas de cultivo brindan un ambiente con máxima humedad, las gotas por presentar una alta relación superficie/volumen, tienden a deshidratarse durante la incubación. Así, un medio formulado para una osmolaridad de 270-300 mOsm/L podría, durante la incubación, aumentar notablemente la concentración de sólidos por evaporación de agua a un nivel incompatible con el desarrollo de las estructuras cultivadas.

1.4 Metodología de la fecundación in vitro de ovocitos

Día 2:

Entre 20 y 24 horas de comenzada la maduración (comienzo de la punción de los ovarios) se procede a la fecundación de los ovocitos, utilizándose para este procedimiento, semen congelado-descongelado.

Previo al comienzo de las maniobras de este día, se deberán retirar las placas de maduración y observar la coloración del medio (recordar que por la presencia de rojo fenol, ante una disminución de pH, común en caso de contaminación bacteriana, el medio virará al amarillo), presencia de hongos, y aspecto de los ovocitos (expansión). Una vez verificado esto, se procederá como se indica a continuación.

1.4.1 Procedimiento detallado

1. Cargar nuevas placas de cultivo con medio de fecundación. De acuerdo a este protocolo, por cada celda se colocarán 400 μ l de medio de fecundación (soluciones salinas: Tirodes-lactato modificado (TALP), IVF-SOF) + 20 μ l de una solución de Heparina diluida en medio de fecundación como inductor de la capacitación espermática. Posteriormente, colocar en estas placas, los ovocitos que fueron puestos a madurar el día anterior.(b)

2. En caso de contar con semen congelado en pellets (pastillas), estas serán descongeladas en 300 μ l de medio de capacitación a temperatura ambiente. En cambio, si el semen se encontrara congelado en pajuela, la misma deberá descongelarse en un baño María a 30°C, durante 30 segundos. Posteriormente, y una vez secada la pajuela, se efectuará el corte de uno de sus extremos y se lo introducirá en un tubo de 5 ml o eppendorf (estériles). Luego se efectuará el corte del otro extremo y se descargará de este modo la columna de semen dentro del recipiente estéril.(b)
3. Independientemente de la forma de la presentación del semen, este deberá ser acondicionado con el propósito de eliminar diluyentes, células muertas, etc., mediante al menos una de dos metodologías.(b)

1.4.2 Acondicionamiento del semen por centrifugación en gradientes de Percoll:

Preparar la columna de percoll en un tubo de centrifuga (14 ml) con 400 μ l de cada una de las soluciones 30, 60 y 90 % de percoll en este orden, por sotoposición.

- Agregar todo el semen descongelado sobre la columna de percoll por la pared del tubo, de modo que este quede depositado en la parte superior de la misma (solución 30%). Tapar el tubo y colocarlo en una centrifuga a temperatura ambiente durante 10 minutos a 600g. (e)
- Transcurridos los 10 minutos, sacar el sobrenadante del tubo (diluyente, células muertas, etc.), tomar el pellet del fondo (150-200 μ l), que contiene los espermatozoides vivos, y colocar en 3,5 ml de medio de capacitación contenido en un tubo de centrifuga (14 ml) (procedimiento de lavado). Este tubo se centrifugará a 200g durante 10 minutos.(e)
- Luego de esto, se eliminará el sobrenadante, quedando en el .pellet, la suspensión de espermatozoides con la cual se procederá a la fecundación. (e)

Se puede aprovechar este tiempo de 10 minutos para cambiar los ovocitos de las placas de maduración a las nuevas placas con medio de fecundación.

1.4.3 *Acondicionamiento del semen utilizando la técnica de Swim up*

- Colocar 1 ml de medio de capacitación en un tubo de centrífuga (14 ml) y dentro de este el total de la pajuela o pastilla de semen. Este tubo será centrifugado durante 10 minutos con el propósito de efectuar un lavado de la muestra.(b)
- Colocar 1 ml de medio de capacitación en un tubo de centrífuga (14 ml) y descargar por sotoposición el pellet obtenido luego de la centrifugación. Este tubo se colocará en baño María, o en estufa, durante 1 hora a 38,5° C. Durante este tiempo, los espermatozoides con motilidad rectilínea progresiva ascenderán en el medio.(b)
- Transcurrido este tiempo, se extraerá el sobrenadante, y se lo descargará en un tubo de centrífuga conteniendo 3,5 ml de medio de capacitación (lavado) durante 10 minutos a 200g.(b)
- Luego de esto, se eliminará el sobrenadante, quedando en el pellet, la suspensión de espermatozoides con la cual se procederá a la fecundación.
(b)

Debido a que mediante esta técnica se obtiene una menor cantidad de espermatozoides comparado con la centrifugación en Percoll, hemos propuesto un procedimiento que permite aumentar la cantidad de dosis inseminantes obtenidas mediante swim up. Este consiste en preparar 4-5 tubos de swim up por cada dosis de semen (pajuela o pastilla). De este modo, al aumentar la superficie disponible para el ascenso de los espermatozoides, se aumenta la eficiencia de la técnica. La principal desventaja de esta modificación es el alto número de tubos necesarios para desarrollarla, lo cual aumenta el costo de cada maniobra.

- Una vez obtenida la suspensión de espermatozoides libre de diluyentes y células muertas, se procede a la determinación de la concentración espermática para efectuar la fecundación con la dosis requerida.
- Preparar la cámara (Neubauer) para conteo de espermatozoides (colocar un cubre-objetos).
- Diluir la suspensión de espermatozoides al 5% en agua. Tomar 95 μ l de agua y agregarle 5 μ l de la suspensión de semen obtenida luego de la última centrifugación con tip estéril.
- Homogeneizar, y cargar la cámara para efectuar el conteo.
- Llevar al microscopio y contar 5 cuadrados de doble borde (x400).
- Cálculo rápido para fecundación: 400 (que corresponde al volumen de medio de fecundación en μ l, que contiene cada celda) dividido por el número de espermatozoides que se contaron.

El resultado corresponde al volumen en μ l que se debe tomar del tubo que contiene los espermatozoides para fertilizar con un millón de espermatozoides por ml de FIV. Colocar en cada celda de la placa de cultivo, la cantidad de semen correspondiente y llevarlas a estufa durante 24 hs. La dosis espermática utilizada es generalmente de 1 a 2 millones de espermatozoides por ml de medio.

En algunas maniobras, el volumen de semen (al final de todos los procedimientos de acondicionamiento) es menor que el requerido para adicionar a las placas a la concentración deseada. En estos casos, se puede proceder de al menos dos modos:

1. Distribuir equitativamente el semen disponible en todos los pocillos de las placas a fecundar, Iniciar una nueva maniobra de acondicionamiento y agregar a los pocillos la cantidad de semen necesaria para alcanzar la concentración deseada. Las desventajas de esta metodología son las siguientes: (e)
 - La fecundación se retrasa como mínimo 20 minutos

- Es necesaria una nueva dosis de semen
 - Mayor consumo de material y de medios, estos últimos no siempre disponibles, lo cual requiere iniciar nuevamente las formulaciones finales, retrasando aún más el procedimiento.
1. Reducir el volumen del medio de fecundación. De este modo a un menor volumen de medio por pocillo, será necesario un menor volumen de semen para mantener la concentración deseada. En caso de reducir el volumen por debajo de 200µl, será necesario cubrir el pocillo con aceite mineral para evitar la evaporación del medio.

1.5 Fecundación en microgotas

Al igual que en la maduración, la fecundación también puede efectuarse en microgotas sobre placas de petri cubiertas por aceite mineral. En este caso, el procesamiento del semen, se efectuará del mismo modo que el descrito previamente. (b)

PROCEDIMIENTO DETALLADO

1. Colocar en un tubo de 5 ml, el volumen, requerido para la confección de las microgotas. Colocar volúmenes equivalentes a los utilizados en las placas de cultivo y al mismo agregarle la cantidad necesaria de heparina.
2. Luego adicionarle la cantidad de medio de capacitación con los espermatozoides, necesaria para alcanzar la dosis inseminante deseada, homogeneizar, y preparar las microgotas como fue descrito en maduración.
3. Lavar los ovocitos puestos a madurar, previo a ser colocados en las microgotas, en medio de fecundación, para no diluir este medio con el de maduración.

4. Una vez que los ovocitos han sido lavados, colocarlos en las microgotas, posteriormente se realiza el gaseado de las fundas ziploc y se los lleva a la estufa.

1.6 Metodología para el cultivo in vitro de embriones

Día 3:

1.6.1. *Eliminación del exceso de células del cumulus (desempaquetado)*

Luego de 24 hs de la fecundación, los presuntos cigotos deben ser denudados (eliminación del cumulus), lavados en medio de cultivo y colocados, en este último, en las placas donde se efectuó la maduración de los ovocitos (co-cultivo con células de la granulosa) o en nuevas placas (sin co-cultivo) y colocados en estufa a 38,5 °C en una atmósfera de 5% de O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂ y humedad a saturación hasta las 48-72 horas, momento en el que se procede al conteo los ovocitos divididos (porcentaje de división a 48-72 Hs). Posteriormente se continúa con el cultivo hasta el día 7 donde se evalúa el porcentaje de producción de embriones, y se procede a su transferencia o criopreservación. (b)

1.6.2. *Procedimiento detallado*

1. Chequear la placa de maduración por posible presencia de contaminación. Se aspira el contenido y se reemplaza por 400 µl de medio de cultivo. En caso de no efectuar co-cultivo con células de la granulosa, se procederá al llenado de nuevas placas. En el caso del período de cultivo, y con el mismo propósito que se describió en el apartado cultivo en microgotas, cada celda deberá cubrirse con 400 µl de aceite mineral. Posteriormente, las placas se colocarán en estufa hasta su utilización.
2. Preparar pipeta con capilar de vidrio, necesaria para el manejo de los embriones.
3. Colocar 400 µl de medio de cultivo en un tubo de centrifuga, y pasar los presuntos cigotos a este, para efectuar el desempaquetado mediante agitación mecánica utilizando un vortex durante 2 minutos.

4. Posteriormente, lavar las paredes del tubo con medio de cultivo, aspirarlo y descargarlo en una placa para la búsqueda, Agregar 400ul de medio en el tubo y enjuagar nuevamente las paredes del mismo.
5. Efectuar la búsqueda y el lavado de los cigotos mediante el pasaje a través gotas de medio de cultivo.
6. Es necesario realizar varios lavados y búsquedas del tubo hasta que no aparezcan más cigotos (2 o 3 veces). Posteriormente observar el tubo bajo lupa para detectar la posible presencia de cigotos adheridos a su pared.
7. Una vez lavados en el mismo TCM-HEPES y seleccionados, colocar los presuntos cigotos en las placas de cultivo previamente preparadas.
8. Colocar la placa en estufa y cultivar bajo las condiciones descriptas.

Otras variantes para el desempaque, además del vortexeo, las constituyen el desnudado utilizando capilar de vidrio o micropipeta de 200 μ l. En el primer caso, un capilar de vidrio es afinado con fuego o con estiradores de capilares y microfraguas, de tal modo que su extremo posea un diámetro aproximadamente igual al de un ovocito. De este modo, al aspirarlo, las células del cumulus son separadas de la zona pelúcida. La micropipeta de 200 μ l se coloca dentro de la celda, y se procede a aspirar y descargar suavemente este volumen hasta que los ovocitos queden desnudos. Luego de esto proceder con el lavado según se indicó previamente. (b)

1.7 Cultivo de embriones en microgotas

Al igual que en maduración y fecundación, el cultivo también puede efectuarse utilizando microgotas cubiertas por aceite mineral. El procedimiento es idéntico al de maduración si se desea efectuar el cultivo en ausencia de co-cultivo, mientras que si se utilizan las placas de maduración, este medio debe ser retirado y reemplazado por medio de cultivo. Para esto, deberá graduarse la micropipeta con un volumen ligeramente inferior al de la microgota, y lavarla dos o tres veces, hasta reemplazar completamente el medio de maduración por el de cultivo. (b)

1.8 Metodologías de uso del medio de cultivo CR1aa y SOF

Estos medios de cultivo, si bien han sido utilizados originalmente suplementados con un 5-10% de suero fetal bovino durante todo el cultivo, últimamente, en búsqueda de un sistema de producción más definido y mejoras en las tasas de supervivencia pos-criopreservación, se han puesto en práctica distintas alternativas al uso mencionado.

Estas son: (b)

- Sin suero: en este caso la suplementación proteica está dada solamente por la incorporación de 3 mg/ml de BSA, como se describe en la formulación de los medios.
- Con suero: a la formulación detallada se le adiciona suero a una concentración final de 5-10%.
- Con suero 5-10% 72 Hs. el cultivo se comienza con sin suero y a las 72 Hs, se agrega 20-40 µl de suero en cada well.
- Sin BSA + suero 5-10%: en este caso el medio se formula como se describió, pero en ningún momento se incorpora BSA, de manera tal que el aporte proteico está dado solo por el suero.

Además de las metodologías mencionadas cabe recordar la posibilidad de efectuar el cultivo en co-cultivo, como se apuntara en el procedimiento detallado.

1.8.1. Congelación

La congelación de los embriones con EG se efectúa del siguiente modo: (e)

1. Preparar la solución de criopreservación (1,5 o 1,78 M de EG con el agregado o no de 0,1 M de sacarosa, en PBS (solución stock) más el agregado, en el momento de efectuar la maniobra, de suero en una

proporción final del 20%. Esta solución se colocará en una placa de petri de 35 mm a temperatura ambiente.

2. Identificar correctamente la pajuela
3. Colocar los embriones en la solución de criopreservación. El tiempo total de exposición de los embriones al crioprotector, deberá ser de alrededor de 10 minutos.
4. Cargar los embriones en las correspondientes pajuelas y cerrarlas con alcohol polivinílico, termosellador o selladores ultrasónicos.
5. Comenzar con el enfriamiento inicial colocando las pajuelas directamente a -7°C en la cámara de enfriamiento de una máquina congeladora programable durante 5 minutos.
6. Efectuar la inducción de la cristalización de manera manual, tocando las pajuelas en uno de sus extremos con un dispositivo metálico enfriado en N_2 líquido. En las máquinas que posee ancriocámara con alcohol metílico y que permita la disposición horizontal de las pajuelas, podrá controlarse visualmente el avance de las columnas de cristalización.
7. Luego de 5 minutos de inducida la cristalización, comenzar el descenso térmico controlado desde -7°C hasta -35°C a razón de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.
8. Una vez alcanzada la temperatura de -35°C , retirar las pajuelas de la cámara de enfriamiento y efectuar el enfriamiento rápido colocando las pajuelas directamente en N_2 líquido.

1.8.2. Descongelación

La descongelación se efectúa a través de la siguiente metodología: (e)

1. Retirar la pajuela del nitrógeno líquido.
2. Exponer la pajuela al aire durante 5 segundos tomándola desde sus extremos. Con este procedimiento evitamos la ruptura del tapón de fábrica y la entrada de agua dentro de la pajuela durante la descongelación.
3. Introducción de las pajuelas en agua a 35°C durante 30 segundos.
4. Cortar el extremo opuesto al del tapón de fábrica y colocarla con este último hacia atrás, en una pistola de transferencia.

5. Cuando se desee efectuar evaluaciones in vitro de los embriones descongelados previo a la transferencia, se deberá proceder como se indica a continuación:
6. Cortar ambos extremos de la pajuela y descargar su contenido sobre una placa de petri de 35 mm. Inmediatamente después, comenzar la búsqueda del o los embriones.
7. Una vez hallados, colocarlos en PBS + suero al 20% durante 10 a 15 minutos. Posteriormente deberán ser lavados mediante pasajes por gotas de esta solución, y cultivados nuevamente para sus evaluaciones posteriores.

Al momento de su utilización adicionar suero al 20% Conservar refrigerado por no más de 30 días. Este medio puede ser utilizado sin el agregado de sacarosa.

1.9 Calidad embrionaria. Códigos de clasificación

De acuerdo a las normas Internacional Embryos Transfer Society (IETS), el código para clasificar la calidad embrionaria basada en la integridad morfológica de los embriones es de tipo numérico. Los códigos de calidad embrionaria varían de 1 a 4 como se explica a continuación. (e)

CLASIFICACIÓN DE CALIDAD EMBRIONARIA SEGÚN NORMAS IETS.

Código	Descripción morfológica
1.- Excelente	<p>Masa embrionaria esférica y simétrica, con células (blastómeros) uniformes en cuanto a tamaño, color y densidad. Este tipo de embrión se considera en su estadio esperado de desarrollo. Las irregularidades deberían ser relativamente menores, y al menos el 85% del material celular debería de ser una masa embrionaria intacta y viable. Esta apreciación deberá basarse en la evolución de la cantidad de células embrionarias presentes en el espacio perivitelino (células extrudadas). La zona pelucida deberá presentar superficies lisas, sin superficie cóncavas, planas o delgadas que pudieran causar adhesión de los embriones al material utilizado durante las manipulaciones</p>
2.- Bueno	<p>Irregularidades moderadas en cuanto al aspecto, forma, tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 50% del material celular deberá encontrarse intacto y corresponderse a una masa embrionaria viable.</p>
3.- Regular	<p>Irregularidades mayores en la forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales. Al menos el 25% del material celular deberá encontrarse intacto y corresponderse con una masa embrionaria viable.</p>
4.- Malo (muerto o degenerado)	<p>Embrión, ovocito o embrión de 1 célula degenerada, no viable.</p>


CAPITULO II


MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización

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

2.1.1. Ubicación del ensayo

País  Ecuador
Provincia  Cotopaxi
Cantón  Latacunga

• Ubicación	 0°55'0"S 78°37'0"O-0.9333333333333333, - 78.61666666666667
• Parroquia	Eloy Alfaro
• Sector	Salache

2.1.2. Condición geográfica

CUADRO N° 1

Vías de comunicación: Vía pavimentada de primer orden a la parroquia Eloy Alfaro, sector Salache.

Servicios: El establecimiento cuenta con agua potable, luz, teléfonos, caminos internos para transporte de personas y el producto, etc.

Fuente: Registro administrativo CEYPSA, 2013

2.2. Materiales

2.2.1. *Materiales de oficina*

- Papelería y materiales
- Computadora
- Impresora
- Calculadora
- Memoria USB

2.2.2. *Materiales de campo*

- Cofia
- Overol
- Botas
- Guantes quirúrgicos
- Ovarios
- Termo de transporte de ovarios

2.2.3. *Materiales de laboratorio*

- Cajas petri grandes
- Cajas petri pequeñas
- Jeringas de 5ml
- Gorras desechables
- Tollas de absorbentes
- Guantes de látex
- Mascarillas
- Fundas Ziploc
- Bisturí # 22
- Agua destilada
- Desinfectantes y antisépticos
- Pipetas Pasteur
- Macropipeta

- Puntas desechables de macropipetas
- Micropipeta
- Puntas desechables de micropipetas
- Holding
- Medio de maduración
- Medio sof
- Medio de fertilización
- Medio de cultivo
- Aceite mineral
- Percoll
- Heparina
- Baño María
- Cámara de flujo laminar
- Pajuelas de 0.25
- Estereomicroscopio tempera
- Termo de nitrógeno líquido
- Nitrógeno líquido
- Tapones de pajuelas
- Tanque mezclado con 90 % de N, 5 % de O₂ y 5 % de CO₂

2.2.4. *Materiales Biológicos*

- Ovarios de cobayos
- Semen de cobayos

2.3. Desarrollo metodológico

2.3.1. *Tipo de investigación*

2.3.1.1. *Investigación Descriptiva*

Consiste en la predicción e identificación de las relaciones que existen entre dos o más variables para llegar a conocer las situaciones y actitudes predominantes a través de la descripción exacta de las actividades, objetos y procesos.

Por lo cual se aplicó este tipo de investigación en el ensayo para el desarrollo del experimento usando las técnicas FIV (fecundación in vitro) y PIV (producción in vitro), para su posterior aplicación en programas de mejora genética.

2.3.2. Metodología

2.3.2.1. Métodos y Técnicas empleadas

2.3.2.1.1. Método Inductivo-Deductivo

El método inductivo consiste en exhibir la manera cómo los hechos particulares (variables) están conectados a un todo (leyes).

El método deductivo muestra cómo un principio general (ley), descansa en un grupo de hechos que son los que lo constituyen como un todo.

Ambas formas de inferencia alcanzan el mismo propósito aun cuando el punto de partida sea diferente.

Por lo que se aplicara este método para el estudio de la producción in vitro de embriones (PIV) ya que es una biotecnología reproductiva que representa una mejora notable de los recursos cunicultores al permitir combinar diversos procesos y técnicas para la conservación de un alto potencial genético en cuyes.

2.3.2.1.2. No Experimental

Se establece que un diseño no experimental es la que se realiza sin manipular deliberadamente variables. Es decir se trata de investigación donde no hacemos variar intencionalmente las variables independientes. Lo que hacemos en la investigación no experimental es observar fenómenos tal y como se dan en su contexto natural, para después analizarlos.

La investigación no experimental es la búsqueda empírica y sistemática en la que el científico no posee control directo de las variables independientes, debido a que sus manifestaciones ya han ocurrido o a que son inherentemente no manipulables. Se hacen inferencias sobre las relaciones entre las variables, sin intervención directa sobre la variación simultánea de las variables independiente y dependiente.

2.3.2.1.3. *La Observación*

Es un proceso cuya función primera e inmediata es recoger información sobre el objeto que se toma en consideración. Esta recogida implica una actividad de codificación: la información bruta seleccionada se traduce mediante un código para ser transmitida a alguien. Por medio del sistema de producción, en los que el observador confecciona él mismo su sistema de codificación.

Por lo que se aplicara en este ensayo en la fase experimental, produciendo resultados que serán una base para el desarrollo de futuras investigaciones en la cual se podría tomar como una referencia para seguir en el desarrollo de investigaciones relacionadas con el tema, teniendo en cuenta los aspectos que se darán para cada una de las variables a investigar.

UNIDAD DE ESTUDIO

En la presente investigación se emplearon ciento ochenta ovocitos obtenidos mediante la técnica de slicing de los ovarios de 30 cobayos hembras post mortem, y el semen se obtuvo de 10 cobayos machos es decir de 20 testículos, para realizar la producción in vitro de embriones de cobayos.

2.4. Desarrollo del ensayo

2.4.1. Colección de células femeninas (hembras)

- Se deberá mantener los ovarios en el laboratorio a temperatura de 35° C, en medio Holding, máximo 4 horas antes de obtener los ovocitos. Que se obtuvo mediante el sacrificio de cuyes hembras.
- Una vez en el laboratorio, los ovarios serán acondicionados, eliminándose los restos de cuerno uterino, oviducto y/o ligamentos y lavados tres veces en solución fisiológica estéril. Posteriormente se procedió a cortar longitudinalmente lo más fino posible para sacar los folículos completos aplicando la técnica sliscing o corte, por el tamaño de los ovarios, procediendo hacer un lavado retrogrado con holdig, en una caja petri.
- Estos folículos completos se depositó en placas petri el cual se deja reposar por 5 minutos en medio holding y se realiza la búsqueda y selección de ovocitos en el estereomicroscopio a un aumento de 15 x con la ayuda de agujas de insulina.
- Solamente ovocitos rodeados por tres o más capas de cúmulo compactas y citoplasma homogéneo fueron utilizados para la fertilización In vitro.
- Se identificó las cajas petri y con un micro pipeta se realiza la colección de ovocitos de buena calidad que resultaron del lavado con holding.
- Los ovocitos seleccionados se transfirieron a las micro-gotas de medio de maduración más SIGMA (mineral oíl) en otra caja petri identificada.
- Se colocó dentro de fundas Ziploc y se llenó con gas compuesto de (Nitrógeno al 90 %, Oxígeno al 5%, CO2 al 5%).
- Esto se lo colocó a baño maría a 38.5 °C, por 24 horas.
- Se efectuó el conteo basándonos en la tabla.

CUADRO N° 2

Características Microscópicas De Ovocitos De Hembras

Categorías			
Criterios	I Bueno	II Regular	III Malo
Morfología	Numerosas células cúmulos compactas	Ovocitos desnudos	Células del cúmulos expandidas
Calidad	Maduros	Inmaduros	Dañados

Fuente: Wood y Wild, 1997

2.4.2. Colección de Células Masculinas (Macho)

- Se extrajo los testículos de los cuyes machos.
- Se retiraron todas las fascias y telas que recubren a estos y se limpia toda la sangre existente.
- Una vez ya limpios los testículos se identifica las partes del epidídimo (Cabeza, cuerpo y cola).
- En la cola del epidídimo se realizó cortes longitudinales y se hace un lavado sobre ya mencionado corte con Andromed haciendo que caiga en una caja petri.
- Este diluyente (Andromed) se preparó 4 en 1 (4 ml de agua bidestilada y 1 ml de Andromed), y se pone en una placa térmica de 35 °C por un momento.
- Se unió estos dos líquidos en un tubo de ensayo y se lo colocó en una placa térmica, se pasa a la máquina de centrifugado por 5 minutos, obteniendo la separación del líquido (diluyente) con las células masculinas (espermatozoides).
- El líquido restante se absorbió con una micro pipeta y se pasa otro tubo de ensayo (la parte más espesa).

- En este tubo se agregó percol y se pasa a la máquina de centrifugado por tres minutos obteniendo las células masculinas (espermatozoides) en la superficie del tubo.
- Estos espermatozoides aptos para la fertilización se los deposita en una caja petri con una gota de heparina por tres minutos en una placa térmica.

CUADRO N° 3
Características Macroscópicas De Semen De Cobayos

Categorías			
Criterios	I Bueno	II Regular	III Malo
Apariencia	Creimosos	Lechoso	Acuoso, con sangre, pus o grumoso
Concentración ml	>0.8 x 10 ⁶	> 0.5 x 10 ⁶	< 0.5 x 10 ⁶
pH	7.7	7.2	6.8 7.0

Fuente: FREEMAN, W. H. y BROEGIDLE, B. 1967.

CUADRO N° 4
Características Microscópicas De Semen De Cobayos Post-Morten

Categorías			
Criterios	I Bueno	II Regular	III Malo
Motilidad individual	5	4	Menos de 2
Motilidad en masa	90 – 95%	80 – 90 %	70 - 80%
Concentración ml	>0.8 x 10 ⁶	> 0.5 x 10 ⁶	< 0.5 x 10 ⁶
Morfología celular	< 5%	5 – 10 %	> 15%
Vivos muertos	< 10%	10- 15 %	>15 – 20 %

Fuente: FREEMAN, W. H. y BROEGIDLE, B. 1967.

2.4.3. Fertilización de Embriones

- Se extrajo los ovocitos después de 24 horas del baño maría y los colocamos en el medio de fertilización.
- Se trasladó los ovocitos ya maduros al medio de mantenimiento para que sean lavados.

- Se colocó aceite mineral en otra caja petri y colocamos los ovocitos con medio de fertilización y los espermatozoides.
- Se colocó dentro de una funda ziploc y se llena con la mezcla de gases (nitrógeno 90%, Oxígeno 5 % y CO2 5%).
- Se ubicó dentro del baño maría a 38.5°C por 72 horas.
- Después de las 72 horas se sacó del baño maría y se lo colocó en la plancha térmica después se realiza otro lavado con holding.
- Se realizó el conteo y la calificación de los embriones, basándose al siguiente cuadro:

2.4.4. Congelamiento y almacenamiento en nitrógeno líquido

Se colocó en pajillas de 0.25mg Una vez terminado el envasado y sellado de las pajillas, se ubica en congelador para que su temperatura baje a 4° C por dos horas, luego se coloca las pajillas en los rack de congelación en un cooler con nitrógeno líquido en el cual se va bajando el rack cada 10 minutos hasta llegar a una temperatura de menos 8, este es una congelación rápida, Luego se pasa las pajillas al termo de nitrógeno para almacenamiento.

CAPITULO III

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente capítulo se detallan los resultados obtenidos en la parte experimental, los mismos que están en base a las variables establecidas.

3.1. Número de ovocitos colectados

CUADRO N° 5

Recuperación De Ovocitos

Número de ovarios	60
Número de ovocitos	180

Fuente: Directa

Elaborado por: SOLÍS RICARDO, CHÁVEZ PAOLA.

En el cuadro N° 5 se observa que de 60 ovarios obtenidos de animales post mortem se recolectaron 180 ovocitos indistintamente de su calidad para maduración in vitro.

3.2 Clasificación de ovocitos

CUADRO N° 6

Categorías De Ovocitos Obtenidos

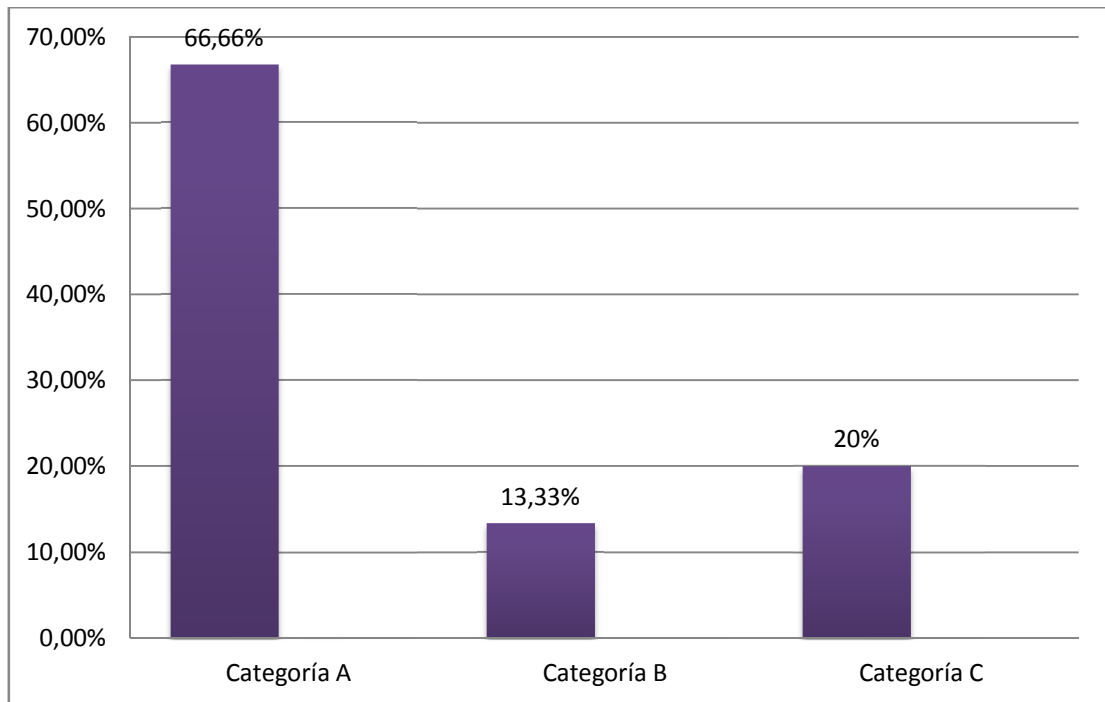
CATEGORIAS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
A	120	66,66
B	24	13,33
C	36	20,00
TOTAL	180	100%

Fuente: Directa

Elaborado por: SOLÍS RICARDO, CHÁVEZ PAOLA.

GRAFICO N° 1

Categorización De Ovocitos



Fuente: Directa

Elaborado por: SOLÍS RICARDO, CHÁVEZ PAOLA.

En el cuadro N° 6 y gráfico N° 1 se aprecia que de los 180 ovocitos recolectados 120 ovocitos son de categoría A (66.66%) y son aptos para maduración in vitro; 24 de categoría B (13.33%) con pequeñas imperfecciones que pueden ser usados en el protocolo de maduración pero en este experimento se descartaron; 36 de categoría C (20%) que no son aptos para maduración in vitro.

3.3 Número de ovocitos maduros y Atrésicos

CUADRO N° 7

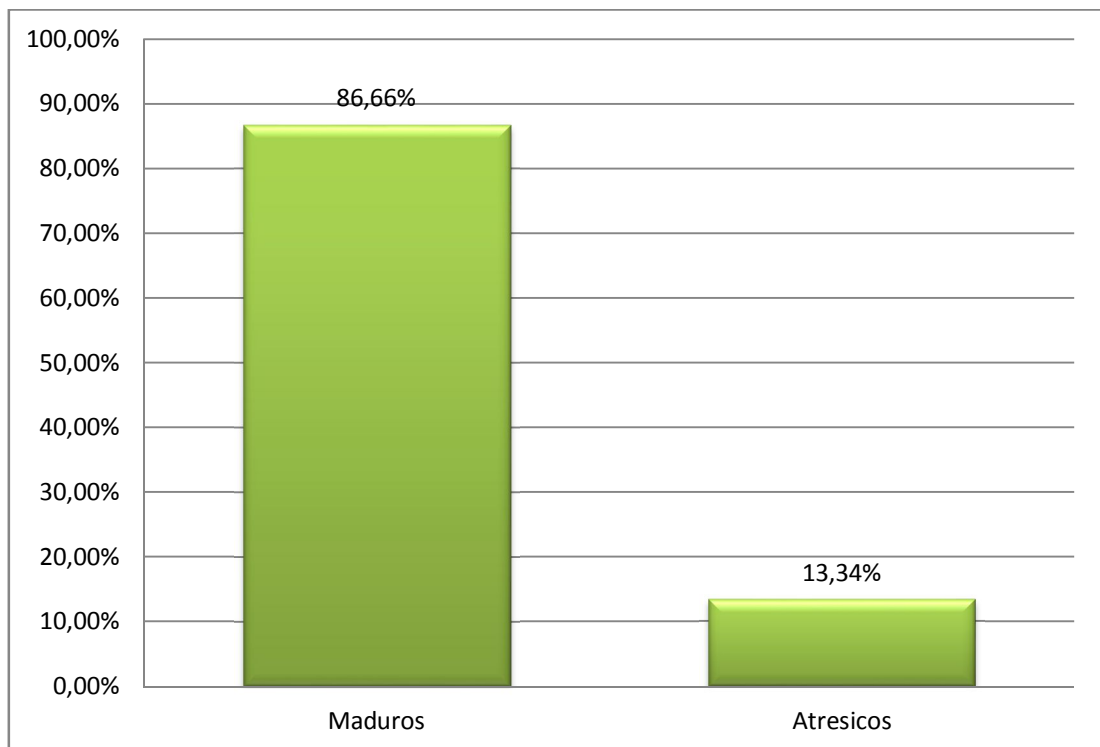
Ovocitos Maduros Y Atrésicos

OVOCITOS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
Maduros	104	86.66%
Atrésicos	16	13,34%
TOTAL	120	100 %

Fuente: Directa
Elaborado por: SOLÍS RICARDO, CHÁVEZ PAOLA.

GRAFICO N° 2

Ovocitos Maduros Y Atrésicos



Fuente: Directa
Elaborado por: SOLÍS RICARDO, CHÁVEZ PAOLA.

En el cuadro N° 7 y gráfico N° 2 se observa que después de la maduración in vitro de los 120 ovocitos se obtuvo 104 ovocitos maduros (86.66%) buenos para ser fertilizados y 16 ovocito (13.34%) Atrésicos que no presentaron maduración y no son aptos para fertilizarlos.

3.4 Número de ovocitos fertilizados

CUADRO N° 8

Número De Ovocitos Fecundados

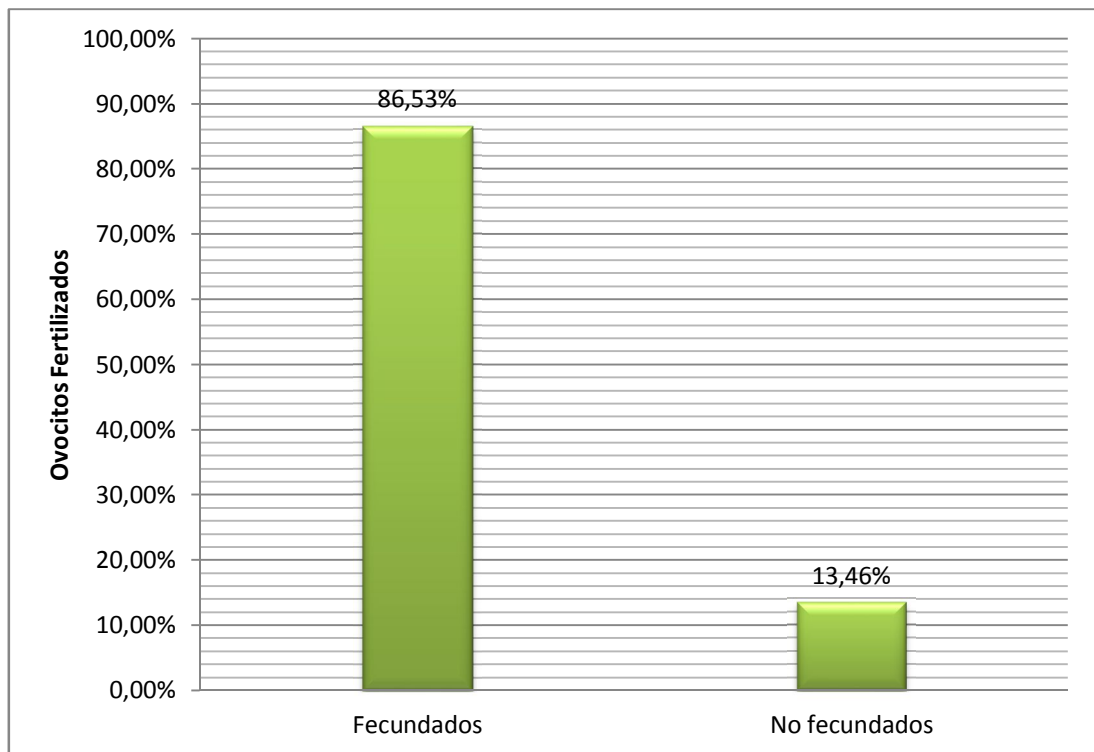
OVOCITOS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
Fecundados	90	86.53%
No Fecundados	14	13,46%
TOTAL	104	100 %

Fuente: Directa

Elaborado por: SOLÍS RICARDO, CHÁVEZ PAOLA.

GRAFICO N° 3

Número De Ovocitos Fecundados



Fuente: Directa

Elaborado por: SOLÍS RICARDO; CHÁVEZ PAOLA.

En el cuadro N° 8 y gráfico N° 3 se ve que de los 104 ovocitos fertilizados se fecundaron 90 y no se fecundaron 14. Correspondiendo a un porcentaje de 86.53 y 13.46 sucesivamente, lo que demuestra que los ovocitos de cobayos muestran una gran resistencia a la manipulación in vitro

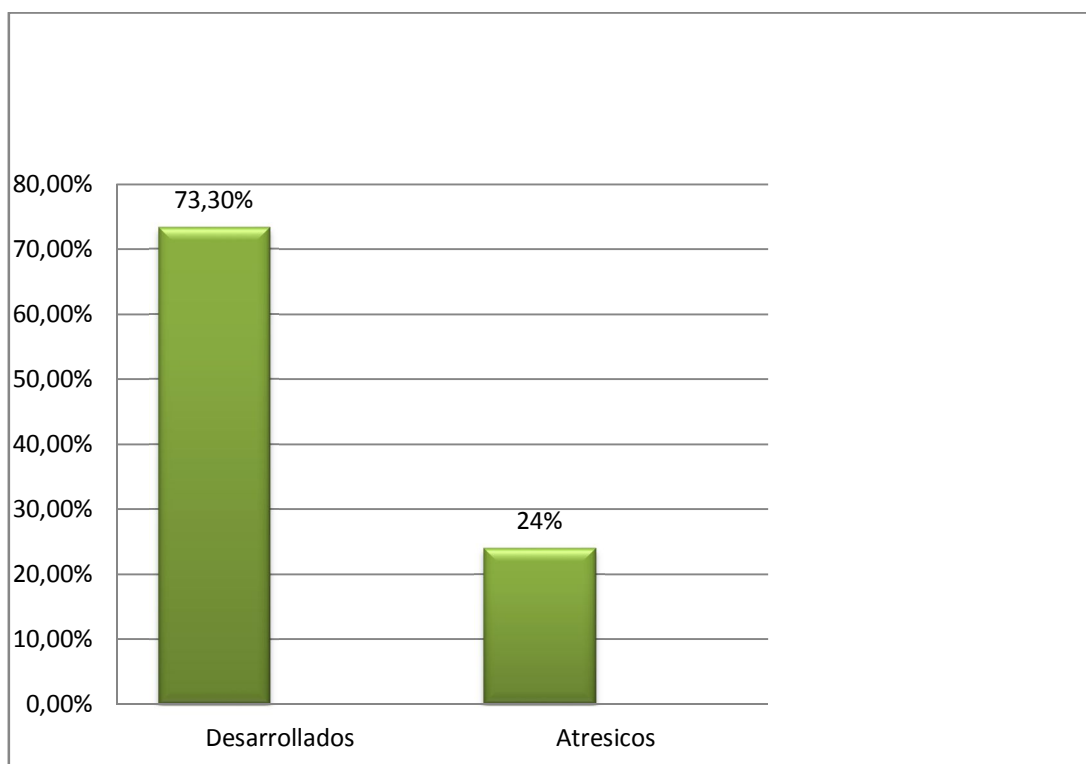
3.5 Número de embriones producidos

CUADRO N° 9
Número De Embriones

Embriones	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
Desarrollados	66	73.3%
Atrésicos	24	26.7%
TOTAL	90	100 %

Fuente: Directa
Elaborado por: SOLÍS RICARDO, CHÁVEZ PAOLA.

GRAFICO N° 4
Número De Embriones



En el cuadro N°9 y gráfico N° 4 representa que de los 90 ovocitos fecundados 66 (73.3%) se desarrollaron convirtiéndose en embriones y 24 (26.7%) sufrieron atresia.

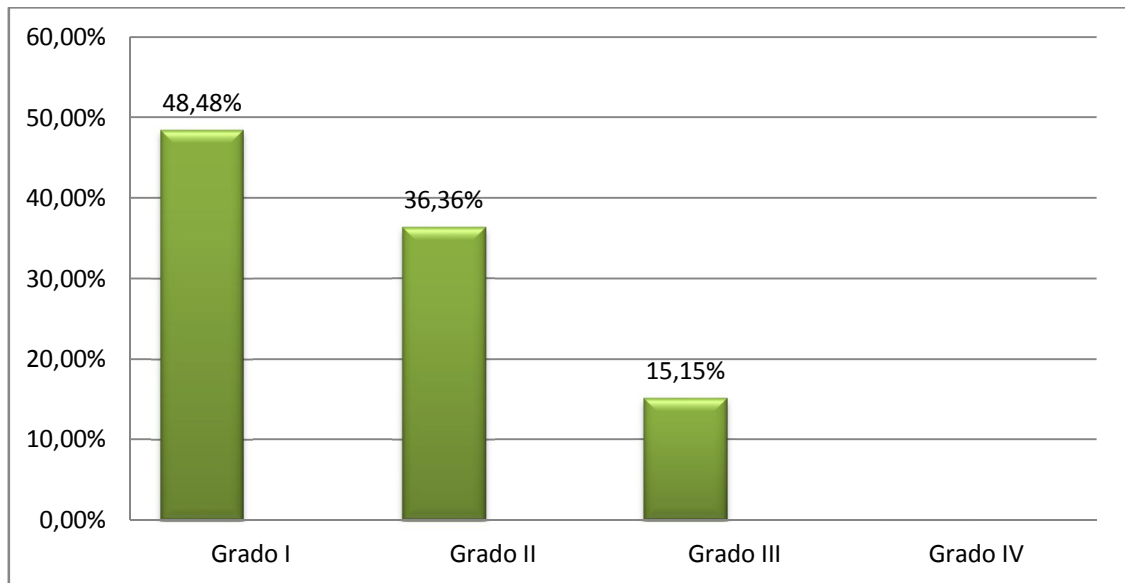
3.6 Clasificación embrionaria

CUADRO N° 10
Calidad De Embriones

GRADO	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
I	32	48.48%
II	24	36.36%
III	10	15.15%
TOTAL	66	100%

Fuente: Directa
Elaborado por: SOLÍS RICARDO, CHÁVEZ PAOLA.

GRAFICO N° 5
Calidad De Embriones



Fuente: Directa
Elaborado por: SOLÍS RICARDO, CHÁVEZ PAOLA.

En el cuadro N° 10 gráfico N° 5 se ve que de los 90 ovocitos fecundados se obtuvo 66 embriones; 32 (48,48%) de Grado I; 24 (36,36%) de Grado II; 10 (15,15%) de Grado III; 0 de Grado IV de los cuales los de grado I y II son aptos para poder ser congelados.

CONCLUSIONES

- Se logró evaluar la producción de embriones mediante la técnica submarine incubation system en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi dando buenos resultados.
- En cuanto a la calidad de ovocitos se obtuvieron 180 de 30 hembras faenadas de los cuales 120 calidad A con el 66.66%, 24 calidad B con el 13.33% y de calidad C 36 que equivale al 20%; lo que determina que el ovocito es muy resistente a la extracción mediante la técnica de slicing.
- En el proceso de maduración a fecundación se observó que 120 ovocitos tipo A 104 maduraron y fecundaron 90 es decir que hasta este momento se perdió 30 ovocitos pero la pérdida es mínima equivaliendo al 25%.
- La técnica SIS (submarine incubation system) nos permite remplazar la incubadora a un baño maría y un cilindro de gas que contiene 90% de N₂, 5% CO₂, 5% O₂; la misma que nos reduce el costo de producción de embriones.
- Mediante esta investigación se logró tener 56 embriones de los cuales Grado I 32, Grado II 24, la verificación de la viabilidad en el descongelamiento se determinó que los embriones de calidad I no varían su grado mientras que el de Grado II la variación es mínima con 4, LOS GRADO 3 NO SE CRIOCONSERVARON YA QUE LA LITERATURA NO RECOMIENDA.

RECOMENDACIONES

- Se debe tener mayor experiencia al momento de realizar la técnica de slicing para así obtener material genético de buena calidad.
- Al momento de la clasificación e identificación de los embriones se debe tener en cuenta algunos parámetros a considerar, por ende se recomienda tener más tiempo y una mayor cantidad de dichas células.
- Al realizar la fecundación in vitro en cobayos se recomienda tener mayor conocimiento de los equipos a utilizar para así obtener resultados favorables.
- Implementar bancos de germoplasma en el laboratorio de la biotecnología de la reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi para determinar y mantener la genética de nuestros cobayos.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía libros

1. ALIAGA L, Selección y Mejoramiento de los cuyes. Universidad Nacional del Centro del Perú. Lima 1990
2. CHAUCA Y ZALDIVAR, Resumen del V Congreso Latinoamericano de cuyes. Maracaibo, Venezuela 1993
3. CAICEDO A, Primer seminario Internacional de Cuyecultura. Editado en la Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia. 1993
4. DAVALOS R, Problemas reproductivos en la crianza de cuyes. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2011.
5. HAFEZ B, Reproducción e Inseminación en animales. (7^a ed.)México, Interamericana-McGraw, ISBN 0-683-30577-8
6. HIDALGO G, Reproducción de Animales Domésticos (3ra ed.) Limusa, ISBN 978-968-18-7132-1.
7. DE LOS REYES, S. M. (1996). Las biotecnologías en la reproducción animal. Avances en producción animal.
8. AGROPECUARIA Instituto Nacional De Tecnología. (2013). E-mail: nmucci@balcarce.inta.bov.ar. Recuperado el 6 de julio de 2013, de LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION.
9. Carmen, D. M. (1995). Área de genética y reproducción. Centro de biotecnología. Genética y Reproducción Animal. Biotecnologías reproductivas. Producción y conservación de embriones in vitro . ISBN.

Bibliografía de internet

- a)** JIMÉNEZ, Adriana, título del documento
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1761/1/17T0791.pdf> en línea 10:30 - 08/03/2013

- b)** CARE Perú
<http://www.care.org.pe/pdfs/cinfo/libro/Guia%20de%20Producci%C3%B3n%20de%20Cuyes.pdf> en línea 10:22 - 18/01/2013

- c)** FRANCISCO J. BÁEZ CONTRERAS
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300007 en línea 14:28 - 14/02/2013

- d)** MARÍA CAROLINA BARAHONA PAUTA, ORLANDO MAURICIO QUISHPE ERAZO
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/653/1/T-UCE-0014-19.pdf> en línea 20h00 – 13/03/2013

- e)** PERUCUY
<http://perucuy.com/site/modules.php?name=News&file=article&sid=8> en línea 13h20 - 13/03/2013

ANEXOS

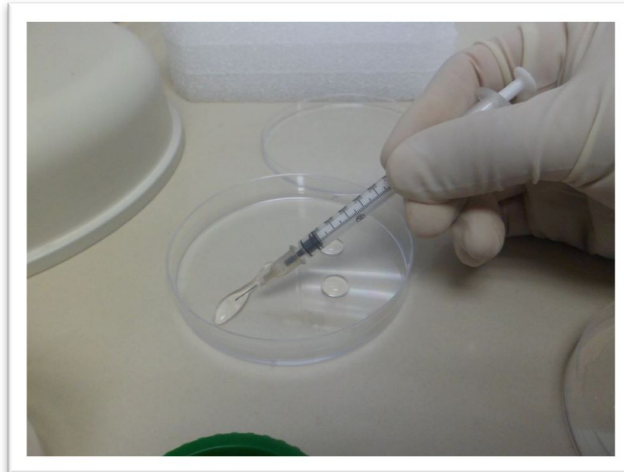
Anexo 1

CORTE Y EXTRACCIÓN DE LOS FOLÍCULOS



Anexo 2

MANIPULACIÓN DE LAS CÉLULAS PARA EL LAVADO



Anexo 3

LAVADO DE LOS OVOCITOS CON EL MEDIO HOLDIN



Anexo 4

LAVADO Y SELECCIÓN DE LOS OVOCITOS



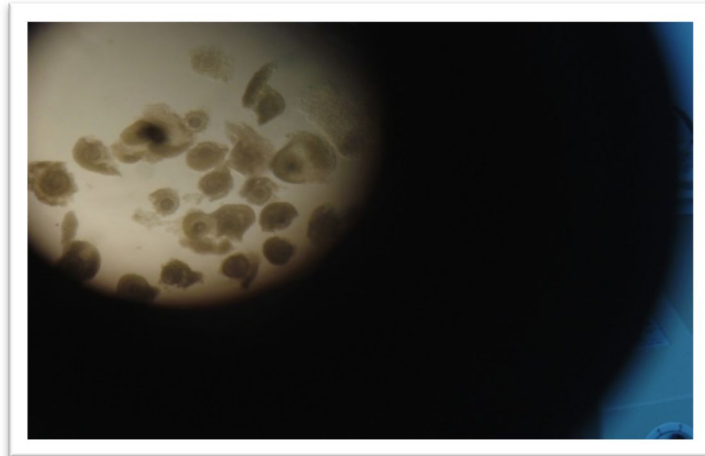
Anexo 5

MANIPULACIÓN DEL MEDIO DE MANTENIMIENTO



Anexo 6

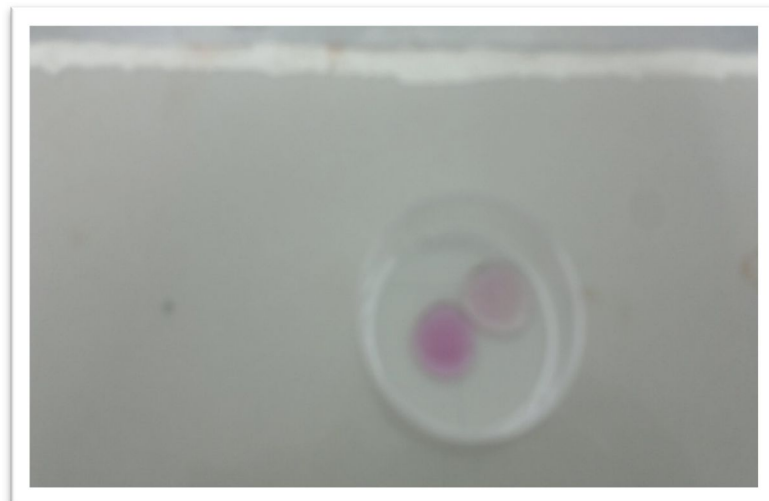
OVOCITOS MADUROS TIPO A



Anexo 7
SELECCIÓN DE OVOCITOS



Anexo 8
OVOCITOS EN EL MEDIO DE FERTILIZACIÓN



Anexo 9

MANIPULACIÓN DE MEDIOS DE FERTILIZACIÓN Y MEDIO DE MADURACIÓN



Anexo 10

COLOCACIÓN DENTRO DE LA FUNDA ZIPLOC



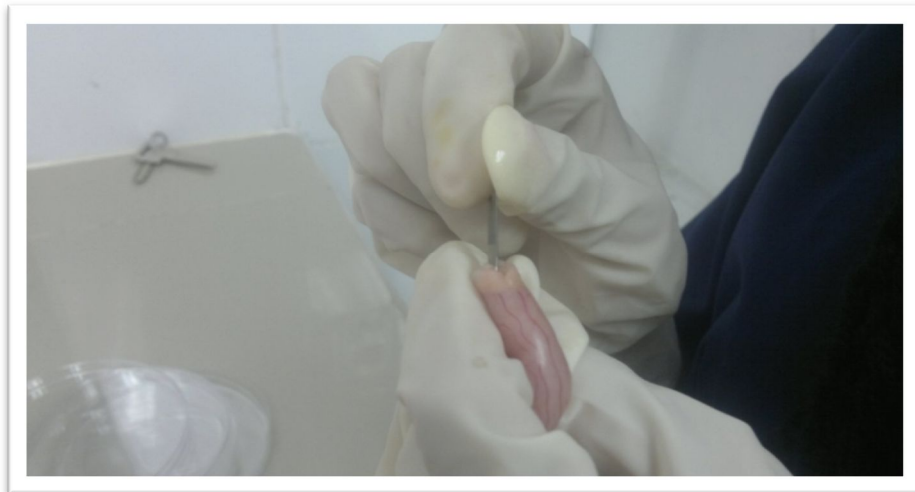
Anexo 11

LLENADO DE LA FUNDA CON LA MEZCLA DE GASES EN EL BAÑO MARÍA



Anexo 12

CORTE DEL EPIDÍDIMO



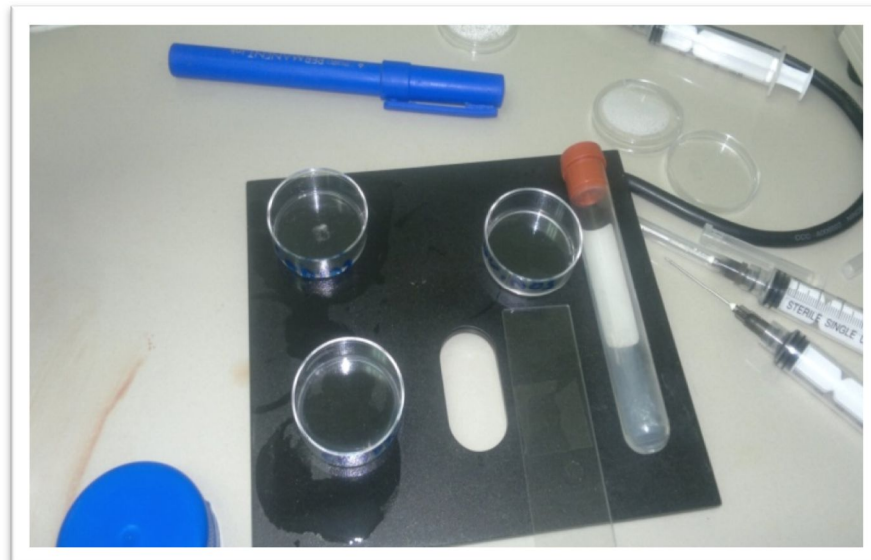
Anexo 13

PREPARACIÓN DEL DILUYENTE



Anexo 14

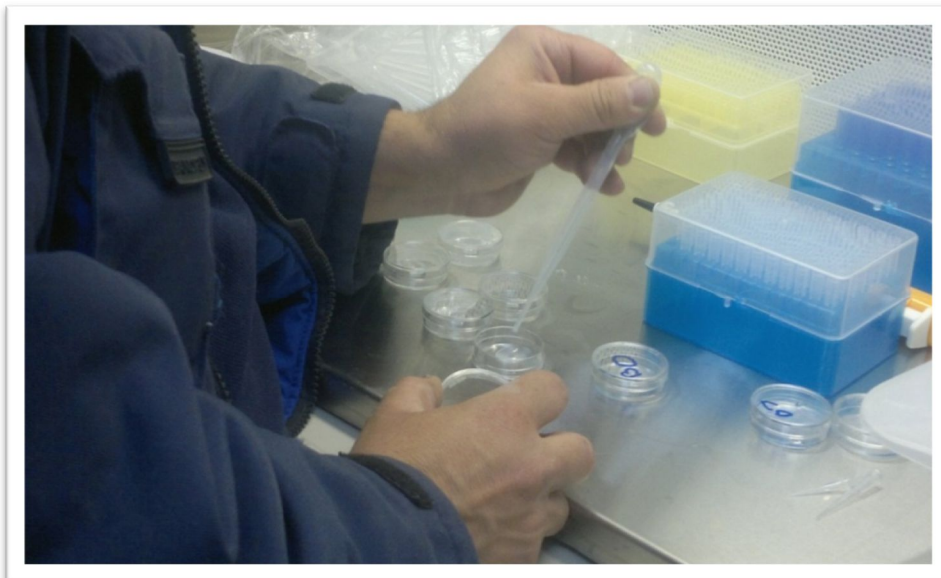
CALENTAMIENTO EN LA PLANCHA TÉRMICA DEL DILUYENTE LA CAJA PETRI EN DONDE SE OBTUVO EL SEMEN Y UNA PLACA PARA EL EXAMEN MICROSCÓPICO



Anexo 15
CENTRIFUGADO DEL SEMEN



Anexo 16
SELECCIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES VIABLES PARA LA
FERTILIZACIÓN



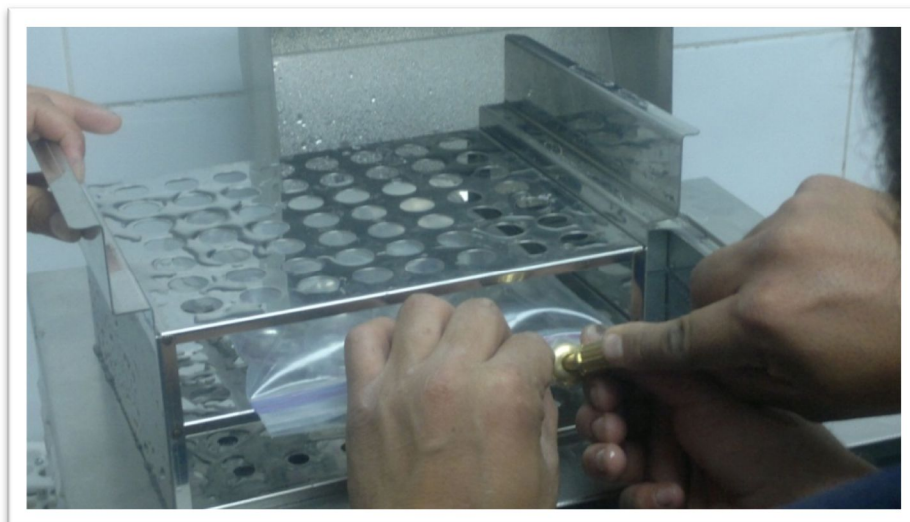
Anexo 17

UBICACIÓN DE LAS CAJAS QUE CONTIENEN LOS OVOCITOS Y LOS
ESPERMATOZOIDES DENTRO DE LAS FUNDAS ZIPLOC



Anexo 18

UBICACIÓN DE LAS FUNDAS ZIPLOC EN EL BAÑO MARÍA A 35.8 ° POR
72 HORAS



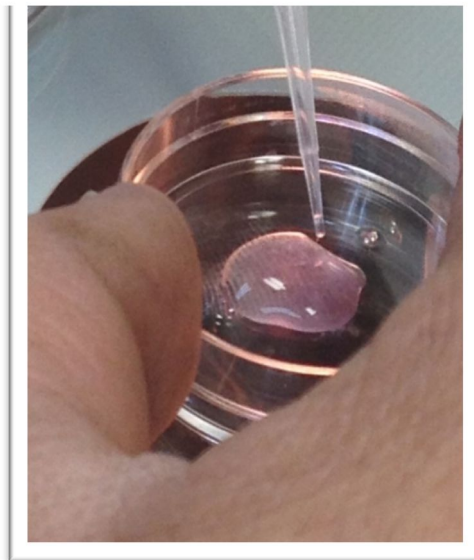
Anexo 19

FUNDAS ZIPLOC DESPUÉS DE 72 HORAS



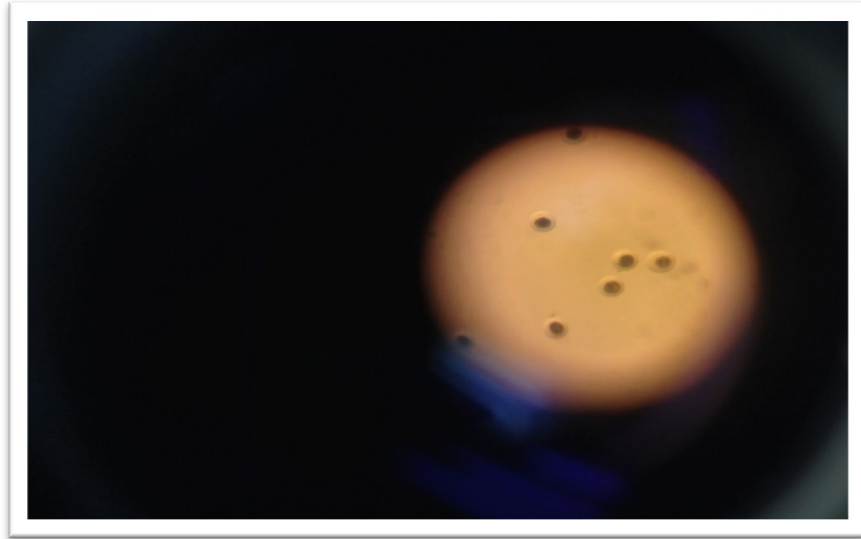
Anexo 20

LAVADO, CONTEO Y CALIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES



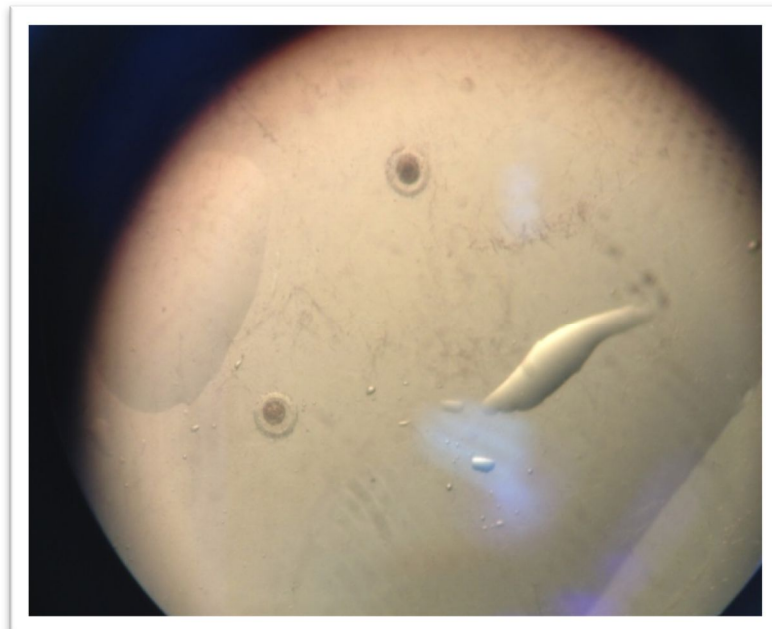
Anexo 21

VISTA DE ESTEREOMICROSCOPIO LAVADO, CONTEO Y
CALIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES



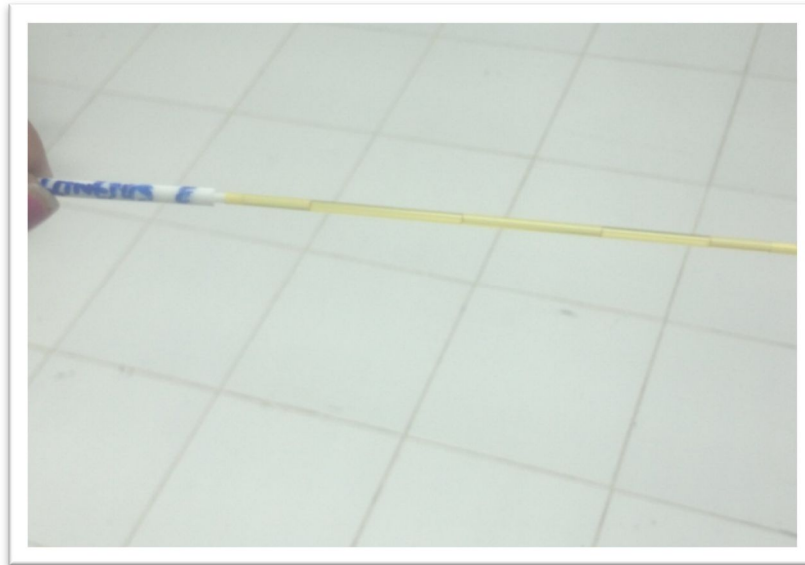
Anexo 22

EMBRIONES DE CALIDAD TIPO I



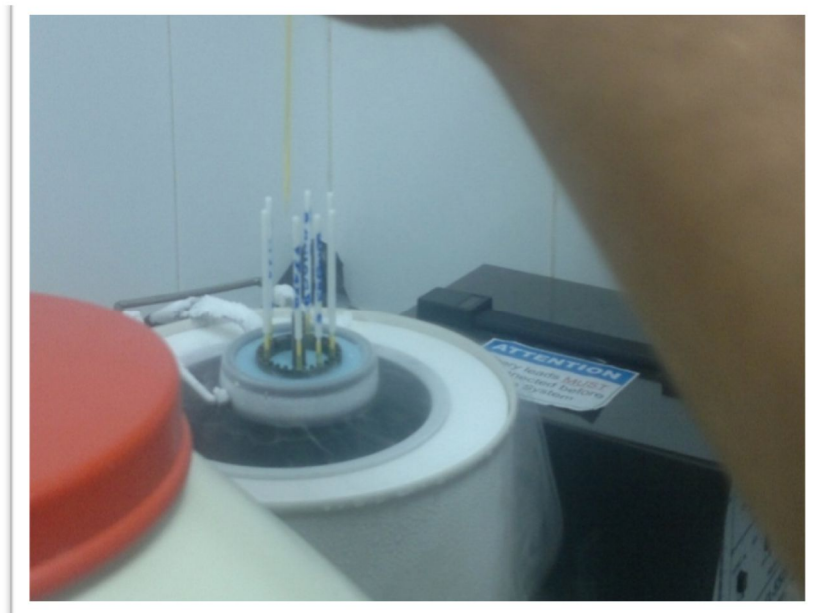
Anexo 23

LLENADO DE LAS PAJILLAS DE 0,25



Anexo 24

CONGELACIÓN DE LOS EMBRIONES EN EL TERMO DE NITRÓGENO LÍQUIDO











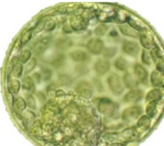
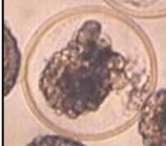
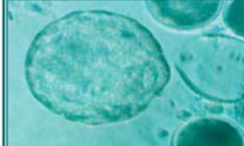
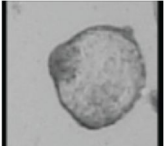
Anexo 25

**ALMACENAMIENTO DE LOS EMBRIONES EN EL TERMO DE
NITRÓGENO LÍQUIDO**



Anexo 26

ESTADIO DE DESARROLLO EMBRIONARIO. CÓDIGOS DE CLASIFICACIÓN.

			
1 Célula	2 Células	4 células	8 células
			
16 células	Mórula temprana	Mórula compacta	Blastocisto temprano
			
Blastocisto	Blastocisto expandido	Blastocisto protruido	Blastocisto protruido expandido

El código para el grado de desarrollo es numérico. El número 1 identifica un ovocito sin fecundar o un embrión de una célula. El número 2 identifica embriones con dos a 16 células. El número 3 identifica una mórula temprana, y los números 4 a 9 identifican a los embriones en estadios posteriores a la compactación, como se ilustra más arriba