

REPÚBLICA DEL ECUADOR
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES

TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TEMA:

**“EVALUACION DE LA PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES EN
OVINOS (*Ovis Orientalis Aries*) EN EL LABORATORIO DE
BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA CARRERA DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD
TECNICA DE COTOPAXI”**

POSTULANTE:

- Edwin Patricio Jaya Saquina
- Luis Freddy Sangoquiza Pilatasig

DIRECTOR A:

- Dra. Paola Lascano

LATACUNGA – ECUADOR

MARZO DEL 2014

AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD

Quien abajo suscribe:

Edwin Patricio Jaya Saquina portador de la C.I. 0502604994, notifica que los resultados obtenidos en la investigación que presento como Trabajo Práctico, previo a la obtención del Título de Médico Veterinario Zootecnista, son absolutamente originales, auténticos y personales.

En tal virtud declaramos que el contenido, las conclusiones y los efectos legales y académicos que se desprenden del trabajo propuesto son de exclusiva responsabilidad legal y académica de los autores.

Atentamente,

Edwin Patricio Jaya Saquina

C.I. 0502604994

AUTORIA

Yo, Luis Freddy Sangoquiza Pilatasig, emito que el trabajo aquí descrito, la responsabilidad de la investigación, ideas ostentadas, resultados y conclusiones de la presente tesis es de mi 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.

Atentamente,

.....
Luis Freddy Sangoquiza Pilatasig

C.I. 050307239-9

AVAL DEL DIRECTORA DE TESIS

En calidad de Director del trabajo de investigación sobre el tema.

“EVALUACION DE LA PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES EN OVINOS (*Ovis Orientalis Aries*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI”

Informe de Investigación presentado por Edwin Patricio Jaya Saquina y Luis Freddy Sangoquiza Pilatasig, consideramos que dicho informe investigativo cumple con los requerimientos metodológicos y aportes técnico-científico suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de validación de la Tesis que el Honorable Consejo Académico de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturalesde la Universidad Técnica de Cotopaxi designe para su correspondiente estudio y calificación.

Latacunga, Febrero del 2014

Dra. Paola Lascano
La Directora

AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

En calidad de miembros de 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 Edwin Patricio Jaya Saquinga, Luis Freddy Sangoquiza Pilatasig con el tema de TESIS:

“EVALUACION DE LA PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES EN OVINOS (*Ovis Orientalis Aries*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI”

Que ha sido revisado, evaluado y aprobado en su totalidad bajo nuestra apreciación

Atentamente:

Dra. Nancy Cueva

PRESIDENTE

Dr. Cristina Bejarano

OPOSITOR

Dr. Cristian Arcos

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

En lo personal, este trabajo representa la concreción de mi labor que como estudiante egresado he realizado. Es por ello, que deseo expresar mi profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma, contribuyeron en esta investigación.

A la Institución que hizo posible la culminación de una etapa más en mi formación académica La Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi (mi Alma Mater),

A mi familia, quien ha apoyado más que nadie el haber llegado hasta aquí. Aunque al final, pero no menos importante a mis Hermanos, Sobrinos, Abuelos, Tíos y Familiares Políticos. Simplemente gracias. Por el apoyo para el logro de una meta más.

EDWIN JAYA

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios por haberme guiado mis pasos por un buen camino y darme salud y vida, sobre todo por cumplir una meta más en mi vida.

A mi madre especialmente por darme la vida, enseñarme a dar los primeros paso y guiarme por un buen camino para poder llegar a ser una persona bien y ayudar a la sociedad.

A mi hogar de estudios Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad Técnica de Cotopaxi por guiarme hacer un profesional con ética.

A mi directora de tesis Dra. Paola Lascano por haber apoyado incondicionalmente en el presente trabajo de investigación. A la Dr. Cristián Arcos por la orientación profesional y el tiempo transcurrido del mismo.

A mi familia por el apoyo y la fuerza incondicional que me brindaron a lo largo de mi formación académica.

Por eso este trabajo es dedicado para ustedes, con unos aprecios fraternos y sobretodo mucho mi cariño.

FREDDY SANGOQUIZA

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres, a mis familiares y amigos/as , por ser el pilar fundamental en mi vida, por todo su esfuerzo y sacrificio, lo que hizo posible el triunfo profesional alcanzado. Para ellos mi AMOR, Y RESPETO.

A MIS CATEDRÁTICOS: Al Prof. Dra. Paola Lascano, directora de este trabajo, por su orientación, dedicación y por la confianza que han depositado en mí.

A todos los docentes de mi querida universidad por los consejos y conocimientos que me impartieron dentro y fuera de las aulas.

EDWIN JAYA.

DEDICATORIA

A DIOS

Principalmente por darme salud, vida, felicidad y sabiduría para llegar a culminar con éxito el esfuerzo de todos estos años de vida académica. Mi más inmenso agradecimiento.

A MI MADRE:

LUZ MARÍA PILATASIG SUNTASIG

Por ser mi guía y el pilar fundamental en el trascurso de mi vida, por todo su esfuerzo, sacrificio, dedicación y comprensión, lo que hizo posible el triunfo profesional alcanzado. Para ti madrecita mi inmenso AMOR, CARIÑO Y RESPETO POR SIEMPRE.

A MIS HERMANOS

RUBEN, MARIA, EDWIN SANGOQUIZA PILATASIG

Por su ayuda y apoyo incondicional que me brindaron en los momentos que más lo necesité, en especial mi hermano Edwin por ser una persona buena con un corazón tan noble mis sinceros agradecimientos.

A MIS CATEDRÁTICOS.

Por ser las guías de la sabiduría, por los consejos y conocimientos que me impartieron dentro y fuera de las aulas durante la vida académica.

LUIS FREDDY SANGOQUIZA PILATASIG.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

N° de pág.

Caratula.....	i
Autoría y responsabilidad.....	ii
Autoría y responsabilidad.....	iii
Aval de la directora de tesis.....	iv
Aval del tribunal de tesis.....	v
Agradecimiento.....	vi
Agradecimiento.....	vii
Dedicatoria.....	viii
Dedicatoria.....	ix
Índice de contenidos.....	x
Funda mementos de la teoría.....	x
Funda mementos de la teoría.....	xi
Capítulo III.....	xii
Conclusiones y recomendaciones.....	xii
Índice de cuadros.....	xiii
Índice de gráficos.....	viii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xv
Introducción.....	1
Objetivos.....	2
Hipótesis.....	2
CAPITULO I	
1.1.1 Los ovarios.....	3
1.1.2 Los oviductos.....	4
1.1.3 Útero.....	4
1.1.4 Cérvix.....	4
1.1.5 Vagina.....	4
1.1.6 Genitales externos.....	4
1.2 Parámetros reproductivos de la oveja.....	4
1.2.1 Edad y peso a la pubertad.....	4
1.2.2 Ciclo estral de la oveja.....	5
1.2.3 El ciclo estral se puede dividir en dos fases.....	5
1,2,4 Tipos de ciclo.....	6
1,2,5 Fisiología Reproductiva.....	6-7
1.2.6 Ovulación.....	8
1.2.7 Grado de ovulación.....	8
1.2.8 Foliculogénesis.....	8
1.2.9 Ovogénesis.....	8-9

1.2.10 Espermatogénesis	10
1.2.11 Fecundación	11
1.3 Maduración y fertilización in vitro de ovocitos ovinos.....	11
1.3.1 Maduración in vitro de ovocitos ovinos.....	12
1.3.1.1 Recolección de ovarios en matadero.	12
1.3.1.2 Obtención de los ovocitos.....	13
1.3.1.3 Para la obtención de los ovocitos, se han descrito dos métodos.....	13
1.3.1.3.1 El método de aspiración.....	13
1.3.1.3.2 El método de corte	14
1.3.1.4 Selección de los ovocitos.	14
1.3.1.5 La clasificación por la apariencia de las células. del cúmulus y del ovoplasma.....	14
1.3.1.5.1 Clasificación de acuerdo a las células de cumulus	14
1.3.1.5.2 Clasificación de cumulus a las células del citoplasma.....	15
1.3.1.6 Maduración in vitro de los ovocitos.....	15
1.3.2 Condiciones medioambientales para la maduración in vitro de los ovocitos.....	16
1.3.2.1 Temperatura	16
1.3.2.2 Presión Osmótica.....	16
1.3.2.3 El Ph	16
1.3.2.4 Atmósfera gaseosa en el incubador	16
1.3.2. 5 Tiempo requerido para la maduración in vitro de los ovocitos.....	17
1.3.2.6 Criterios empleados para determinar la maduración.....	17
1.4 Fertilización in vitro de ovocitos ovinos.....	18
1.4.1 Preparación del semen de carnero	18
1.4.1.1 Lavado del semen y separación de espermatozoides móviles y no móviles.....	18
1.5 Cocultivo de los ovocitos con las células espermáticas.....	19
1.6 Condiciones medioambientales para el cocultivo in vitro de los ovocitos y los espermatozoides.....	19
1.7 Criterios empleados para determinar la fertilización.....	19
1.8 Efecto negativo y un efecto positivo, sobre el desarrollo del embrión.	20
1.8.1 Condiciones medioambientales para el cultivo in vitro de los cigotos y embriones ovinos.....	20

CAPÍTULO I:

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Características del lugar.....	21
2.1.1. Situación política.....	21
2.1.2. Situación geográfica.....	21
2.1.3 Datos meteorológicos.....	21

.1	Materiales.....	22
2.2.1	Unidad de Estudio.....	22
2.2.2	Materiales de oficina.....	22
2.2.3	Recursos tecnológicos.....	22
2.2.4	Materiales de laboratorio.....	22
2.2.5	Equipos de Laboratorio.....	23
2.2.6	Sustancias.....	23
2.2.7	Materiales de Campo.....	23
2.2.8	Material biológico.....	24
.2	Características de los Equipos Utilizados.....	24
2.3.1	Baño maría.....	24
2.3.2	Centrifuga.....	25
.2.3	Estéreo microscopio.....	25
.2.4	Diseño.....	25
.2.5	Cámara flujo laminar.....	26
.2.6	Características generales.....	26
.2.7	Modo de operación.....	26
.2.8	Micropipetas.....	27
.2.9	Descripción del equipo.....	27
.2.10	Suero Fisiológico.....	28
2.4	Métodos y Técnicas.....	28
2.4.1	Método estadístico.....	28
2.4.2	Investigación descriptiva.....	28
2.4.3	Investigación no experimental.....	28
2.5	Metodología.....	29
2.6	Técnica de Investigación.....	29
2.6.2	Metodología, Práctica empleada.....	29
2.6.3	Transporte de Ovarios.....	29
2.6.4	Preparación del laboratorio.....	30
2.6.5	Desarrollo de la práctica.....	30
.6.5.1	Maduración in vitro de ovocitos.....	30
2.6.5.1.1	Obtención de los ovocitos por el método de corte.....	31
2.6.5.1.2	Clasificación de los ovocitos.....	31
2.6.4.1.3	Cultivo <i>in vitro</i> de ovocitos.....	32
2.6.5.2	Capacitación Espermática.....	33
2.6.5.3	Fertilización de los ovocitos.....	34
2.6.5.4	Crio conservación de los embriones.....	35

CAPÍTULO III

	Análisis y discusión de los resultados.....	36
3.1	Resultados.....	36
3.2	Maduración y fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos.....	36

3.2.1 Obtención y clasificación de ovocitos.....	36
3.2.2 Ovocitos Madurados.....	38
3.2.3. Fertilización de Ovocito.....	40

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones.....	41
Recomendaciones.....	42
Bibliografía.....	43-47
Anexos.....	51

ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICOS

ÍNDICE DE CUADROS

N° de pág.

Cuadro N: 1 Parámetro reproductivo de la oveja.....	5
Cuadro N. 2 Número de Ovocitos Recolectados.....	37
Cuadro N.-3 Porcentajes de Ovocitos Recolectado.....	38
Cuadro N.-4 Porcentajes de Ovocitos Madurados.....	39
Cuadro N.-5 Fertilización de Ovocitos Maduros.....	40

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó una alternativa tecnológica que es la “producción In vitro de Embriones en ovinos” (*Ovis orientalis aries*) su factibilidad técnica y económica que de modo a una opción viable y a futuro ayude a conservar embriones de especies con línea genética originarias de este lugar. Para dicho efecto, se planteó como objetivo evaluar la producción in vitro de embriones en ovinos en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Cotopaxi”. La metodología de investigación utilizada fue: de tipo descriptivo y no experimental ya que se posibilitó observar fenómenos tal y como se dan en su contexto natural, luego se analizó los parámetros mediante, cuadros y pasteles. Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi”, ubicado en el barrio Salache, Cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi. Donde se obtuvo el número de 90 ovocitos de 50 ovarios recolectados en el camal de Saquisilí, dando un promedio de ovocitos aptos por ovario de 1.2 y el número de ovocitos no aptos de 1.66 por ovario, para ser madurados in vitro. Aplicando la Técnica de Submarin Encubation System en el presente estudio, se obtuvo índices medios de maduración y fertilización in vitro de los ovocitos seleccionados, esto demuestra que los medios y las condiciones de cultivo utilizados en el presente estudio.

ABSTRACT

In the present research was assessed a technological alternative that is "In vitro embryos production in sheep" was evaluated (*Ovis orientalis aries*) its technical and economic feasibility if it is a viable option and in the future to help to preserve species embryos with originating genetic line in this place. To this effect, it suggested as objective to evaluate the in vitro embryo production in sheep in the Biotechnology Reproductive Laboratory in the Veterinary Medicine major Animal major at the Technical University of Cotopaxi ". The research methodology used was: descriptive and non-experimental because it allowed observe phenomena as they exist in their natural context, then It analyzed, for which were described by the parameters, statistical, pastels. This research was conducted in the Biotechnology reproduction Laboratory at Technical University of Cotopaxi ", it located in the Salache, neighborhood Latacunga Canton, Cotopaxi Province. Where It obtained the number of 90 oocytes from 50 ovaries collected at the slaughterhouse in Saquisilí giving an averaged of eligible oocytes per ovary of 1.2 and the number of oocytes no survival of 1.66 per ovary, to be matured in vitro. It applying the Technique Submarine Incubation System in the present study, average rates of maturation and fertilization in vitro of selected oocytes were obtained, it shows that the media and the culture conditions used in this study.

INTRODUCCIÓN

El ovino es una especie que ha acompañado al pequeño y mediano productor agropecuario durante muchos años, siendo una fuente importante de alimento y sustento en el Ecuador.

Derivado de la cría de ovinos se obtienen múltiples productos: carne de gran valor nutritivo y muy aceptado en el mercado, pieles de buena calidad, leche con alto valor nutritivo, lana importante a nivel artesanal y otros subproductos potencialmente utilizables en industria y alimentos.

Para rescatar este patrimonio tan valioso, es necesario implementar y adecuar sistemas de producción que permitan mejorar la actividad, ofreciendo mejores condiciones a los animales en aspectos de nutrición, manejo, reproducción, mejoramiento y sanidad; en el marco de proyectos empresariales agropecuarios organizados a nivel gremial.

Con el presente estudio se pretende evaluar una alternativa tecnológica que es la “producción In vitro de Embriones en ovinos” (*Ovis orientalis aries*) su factibilidad técnica y económica de modo a una opción viable, a futuro ayude a utilizar ovarios de animales que son sacrificados en los camales de nuestra provincia, en el cual generar ingresos económicos adicionales a las personas dedicadas a la explotación de la especie antes mencionada.

La ovinocultura es una buena alternativa de producción agropecuaria debido a la suma de cualidades que tiene la especie y las posibilidades geográficas Ecuatorianas que la hacen viable, y las condiciones favorables que presenta el mercado debido a su creciente demanda; esta situación convierte a los ovinos en una de las especies con más perspectiva de desarrollo en el área pecuaria en el Ecuador.

Por tanto en esta investigación se ha planteado los siguientes objetivos:

OBJETIVO

Objetivo general

- Evaluar la producción in vitro de embriones en ovinos (*ovis orientalis aries*) en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Cotopaxi”.

Objetivos específicos

Establecer parámetros de calidad y madurez de ovocitos para la fertilización.

- Determinar por categorías los embriones de ovejas luego del proceso de fertilización y cultivo.
- Analizar el número de embriones fértiles y los que no alcanzaron a fertilizar.

HIPÓTESIS

Hipótesis alternativa (H1):

Mediante la técnica de fertilización in vitro se podrá obtener embriones de ovinos aptos para ser transferidos.

Hipótesis nula (H0):

Mediante la técnica de fertilización in vitro no se podrá obtener embriones de ovinos aptos para ser transferidos.

.

CAPÍTULO I

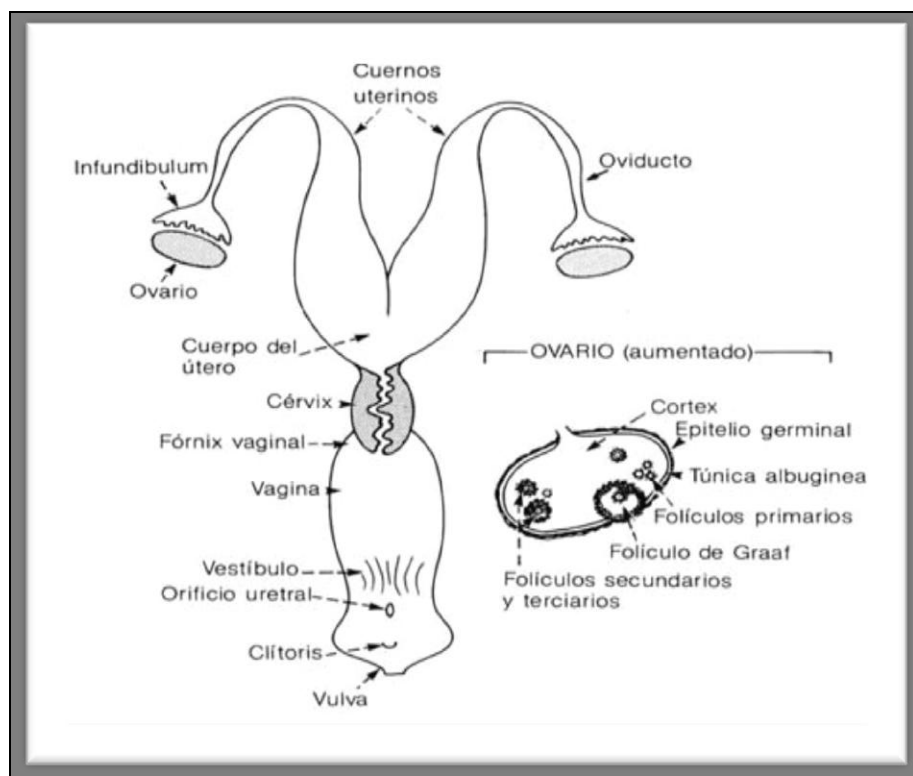
1. MARCO TEÓRICO

1.1 Anatomía del sistema reproductor de la oveja

Los órganos reproductores de la oveja son los ovarios, oviductos, útero, cérvix y vagina, como se demuestra en la figura uno. (a)

Gráfico N: 1

Anatomía del sistema reproductor de la oveja



Fuente: DURAN Felipe; 2005; Manual de reproducción en ovejas y borregos.

1.1.1 Los ovarios

Son los órganos esenciales para la reproducción de la hembra. Pueden situarse en la cavidad pélvica o en la abdominal dependiendo de la edad.(b)

1.1.2 Los oviductos

Los dos oviductos (o trompas de Falopio) son tubos tortuosos de unos 10 – 20 cm de longitud, cada uno, se extiende desde los ovarios a los cuerpos uterinos; Están suspendidos por una delgada membrana (mesosalpinx), que es parte del ligamento ancho, que sustenta el útero. (1)

1.1.3 Útero

Es el órgano donde se lleva a cabo la gestación: responsable del desarrollo del embrión (luego feto) hasta el momento del parto. El útero de los animales domésticos consta de un cuello uterino cérvix, un cuerpo y dos cuernos. (c)

1.1.4 Cérvix

Es una estructura con forma de esfínter con pliegues y criptas que tiene como principal función la de actuar como una barrera separando el útero que es una zona limpia de la vagina. Esta función es esencial para que una gestación se desarrolle sin problemas. (d)

1.1.5 Vagina

Órgano copulativo femenino, está situada en la cavidad pélvica entre el recto y la vejiga de la orina, dorsalmente y la uretra ventralmente; mide 8 cm de largo. (2)

1.1.6 Genitales externos

El vestíbulo, los labios mayores, labios menores, el clítoris y las glándulas vestibulares constituyen los genitales externos. (e)

1.2 Parámetros reproductivos de la oveja

1.2.1 Edad y peso a la pubertad

La pubertad o edad de la primera ovulación en la hembra, se presenta entre los 6 a 9 meses en la oveja. (c)

En la oveja la pubertad es fluida por los factores genéticos y ambientales tales como la raza y tipo, niveles nutricionales y épocas del nacimiento. El primer estro ocurre cuando pasan los 30 a 50Kg (50% a 70% del peso corporal del adulto) (3)

Cuadro 1:

Parámetro reproductivo de la oveja

Clasificación del ciclo estral	Polièstrica estacional de día corto
Entrada a la pubertad	7 meses (5-14)
Duración del ciclo estral	17 días (14-19)
Duración del celo	30 horas (24-36)
Momento de la ovulación	20 a 30 horas después del inicio del celo
Gestación	150 días (140-159)

(f)

1.2.2 Ciclo estral de la oveja

La cadena de acontecimientos que se repiten y conducen a los periodos estrales regulares recibe el nombre de ciclo estral. El estro es el periodo fértil y si la hembra no concibe, se repite cada 16-17 días en la mayoría de las ovejas; En los animales más jóvenes este intervalo puede ser menor de 1 a 2 días (f)

1.2.3 El ciclo estral se puede dividir en dos fases

La fase folicular (periodo de crecimiento folicular) y fase lútea (periodo de cuerpo lúteo). El estro se presenta en la última parte de la fase folicular, fase que es relativamente corta, solo consta de 3 a 4 días, ocupado la fase lútea el resto de ciclo (unos 13 días en la oveja). (g)

Desde la pubertad, o edad de la primera ovulación en la hembra se presenta entre los seis a nueve meses en la oveja, excepto durante la gestación y lactación o en casos patológicos de anestro. (4)

A partir del hipotálamo, se secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) hacia la adenohipófisis, la cual secreta las gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) que van a actuar sobre el ovario. (b)

Aunque ambas gonadotropinas actúan de forma sinérgica, es la FSH la principal responsable del crecimiento folicular. (2)

Según se van desarrollando los folículos, va aumentando la cantidad de estrógenos secretados, siendo responsables de los síntomas de celo en la oveja:

Síntomas de celo en la oveja:

- Vulva sonrojada y edematosa,
- Vulva húmeda con descarga de flujo vaginal transparente, blanquizca o cremosa.
- Orina frecuentemente.
- Balidos frecuentes.
- Movimiento rápido de la cola hacia los lados y este movimiento es más precipitado cuando están cerca del Macho e Intranquilidad. (1)

1.2.4 Tipos de ciclo

Los ovinos son poliestrísticos estacionales: Repiten su ciclo regularmente pero en determinada estación del año, como en el caso de las yeguas cuyo ciclo estral es de fotoperiodo largo (verano - primavera), o de las ovejas cuyo ciclo es de fotoperiodo corto (invierno - otoño). (h)

1.2.5 Fisiología Reproductiva

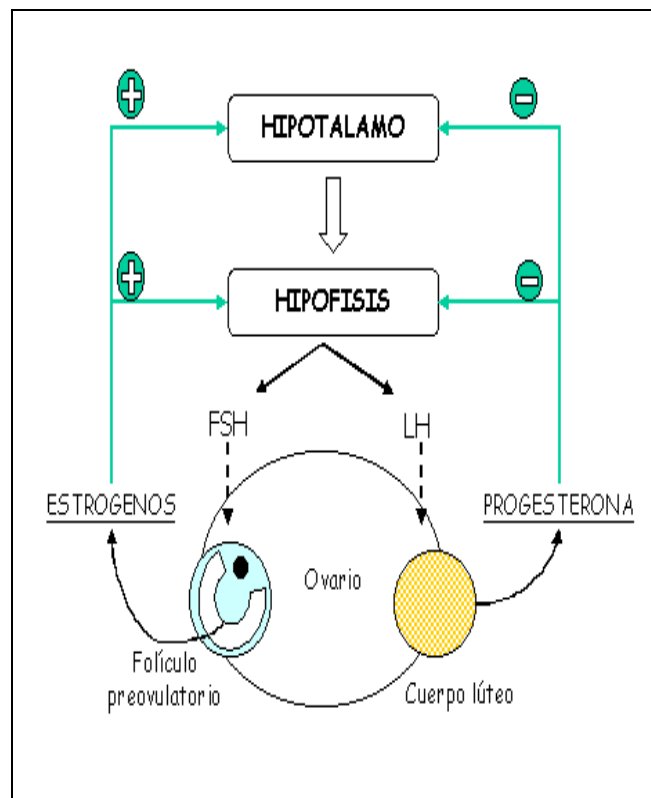
A partir de un nivel determinado de estrógenos en sangre, se produce una retroalimentación positiva sobre el hipotálamo provocando la secreción por parte de la hipófisis de la llamada descarga preovulatoria de LH, principal responsable de la ovulación de los folículos maduros o preovulatorios. (2)

Al producirse la ovulación, los niveles de estrógenos descienden y comienzan a aumentar los niveles plasmáticos de progesterona, secretada por los cuerpos lúteos que se están formando en los folículos ovulados. (a)

La progesterona es la responsable de la preparación del endometrio para que se produzca la anidación del embrión. También por medio de una retroalimentación negativa, evita la secreción de GnRH por parte del hipotálamo y por consiguiente, la secreción de FSH y LH y no hay crecimiento de nuevos folículos. (j)

Gráfico N: 2

Fisiología Reproductiva



Fuente: Revista Científica, Fertilización in vitro FCV – LUZ / VOL, III, N: 3, 1993

1.2.5.1 Ovulación

Es el proceso mediante el cual se rompe el folículo maduro y se libera el ovulo madura, ocurre de manera espontánea, es decir tenga o no la oveja contacto con el macho. (5)

El tiempo de la ovulación está relacionado con la aparición del estro; en las ovejas merinas normalmente ocurre entre 25 y 30 horas después de la aparición del estro, por tanto, la ovulación se presenta hacia el final del estro. Cuando maduran dos o más folículos, en el mismo ciclo estral, los huevos se liberan con 2 y 3 horas de diferencia entre ellos. (c)

1.2.5.2 Grado de ovulación

El grado de ovulación (número de huevos liberados en la ovulación) viene determinado por el número de folículos que se desarrollan hasta el estado de folículo de Graff. (6)

1.2.6 Foliculogénesis

Un extenso estudio condujo a Scaramuzzi, a proponer un modelo para el crecimiento folicular desde la etapa primordial hasta la de folículo ovulatorio en la oveja. Los folículos pueden estar inactivos (primordiales) destinados al crecimiento (preantrales) pueden ser ovulatorios o atresicos. (7)

Los folículos preantrales reaccionan a la gonadotropina, pero pueden seguir creciendo en ausencia de FSH y LH. En una etapa posterior de crecimiento, los folículos preantrales son sensibles a las gonadotropinas. La ovulación tiene lugar después de una oleada de LH; en caso contrario, ocurre atresia. (d)

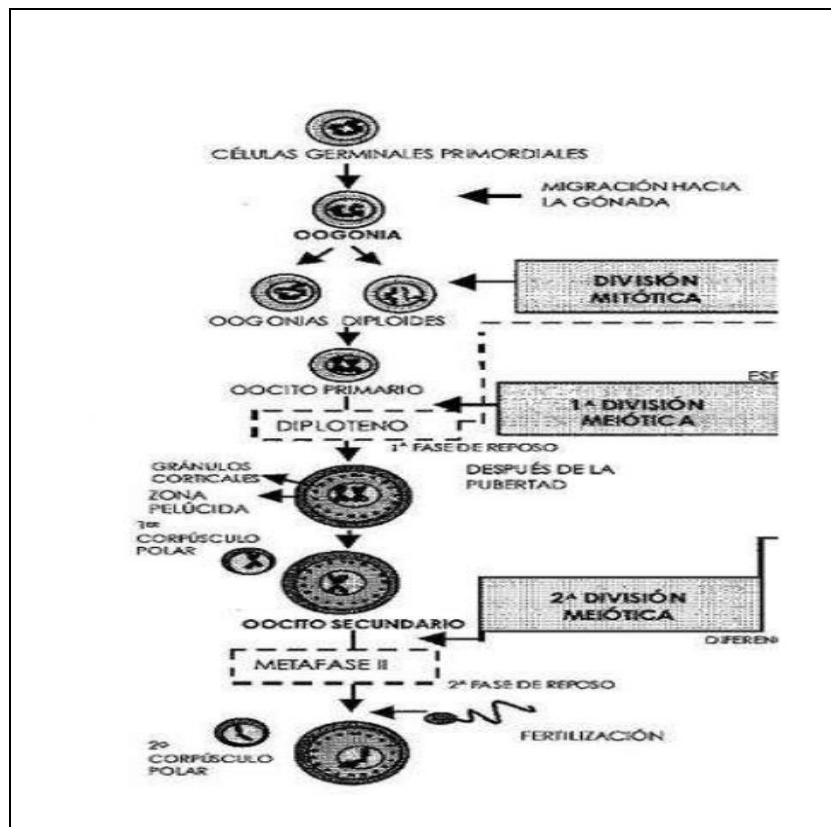
1.2.7 Ovogénesis

La ovogénesis es la gametogénesis femenina, es decir, el desarrollo y diferenciación del gameto femenino u óvulo mediante una división meiótica y se lleva a cabo en los ovarios. (4)

Este proceso se produce a partir de una célula diploide y se forman como productos una célula haploide funcional (el óvulo) y tres células haploides no funcionales (los cuerpos polares). La ovogénesis constituye el proceso de formación de los ovocitos a partir de las ovogonias. (k)

Gráfico N.- 3

Ovogénesis



Fuente: Hafez-B; 2000; Reproducción e inseminación artificial en animales

A partir de una ovogonias se desarrollan 4 ovocitos primarios, teniendo lugar su crecimiento dentro del folículo primario. (3)

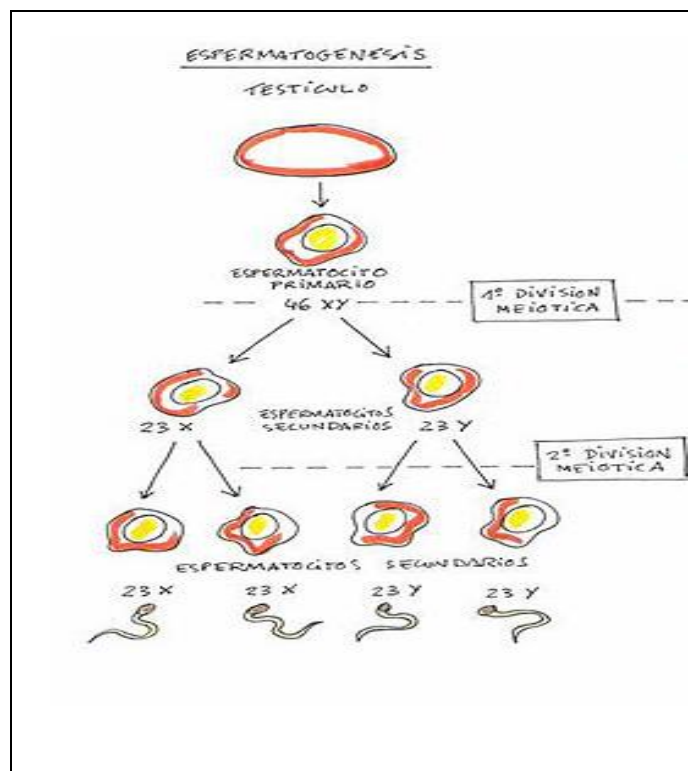
El folículo se divide en forma asimétrica, para producir dos células hijas haploides ambas contienen la información genética, pero la mayor parte del citoplasma se queda en una de ellas, ovocito secundario, mientras que la otra está constituida exclusivamente por el núcleo y se denomina primer cuerpo polar.(d)

1.2.8 Espermatogénesis

La espermatogénesis se halla bajo la influencia de la acción combinada de las hormonas FSH y LH. La primera inicia la espermatogénesis en la al estimular la producción de testosterona culmina el trabajo iniciado por la FSH. (1)

Gráfico N: 4

Espermatogénesis



Fuente: IVAN Albarán 2002; Reproducción de Animales Domésticos

La espermatogénesis es la suma de las transformaciones que dan como resultado la formación de los espermatozoides de una espermatogonia mientras se mantiene el número de espermatogonias. La división posterior para formar dos espermatocitos primarios en los cuales se produce la meiosis, para dar lugar a los espermatocitos secundarios y finalmente la espermátide, posteriormente sufre la transformación o diferenciación en espermatozoides. (8)

1.2.9 Fecundación

La fecundación es la fusión del huevo y un espermatozoide, lo que da lugar a la formación de una célula diploide, esta nueva célula diploide (con 2n cromosomas) reciben el nombre de embrión o cigoto. (6)

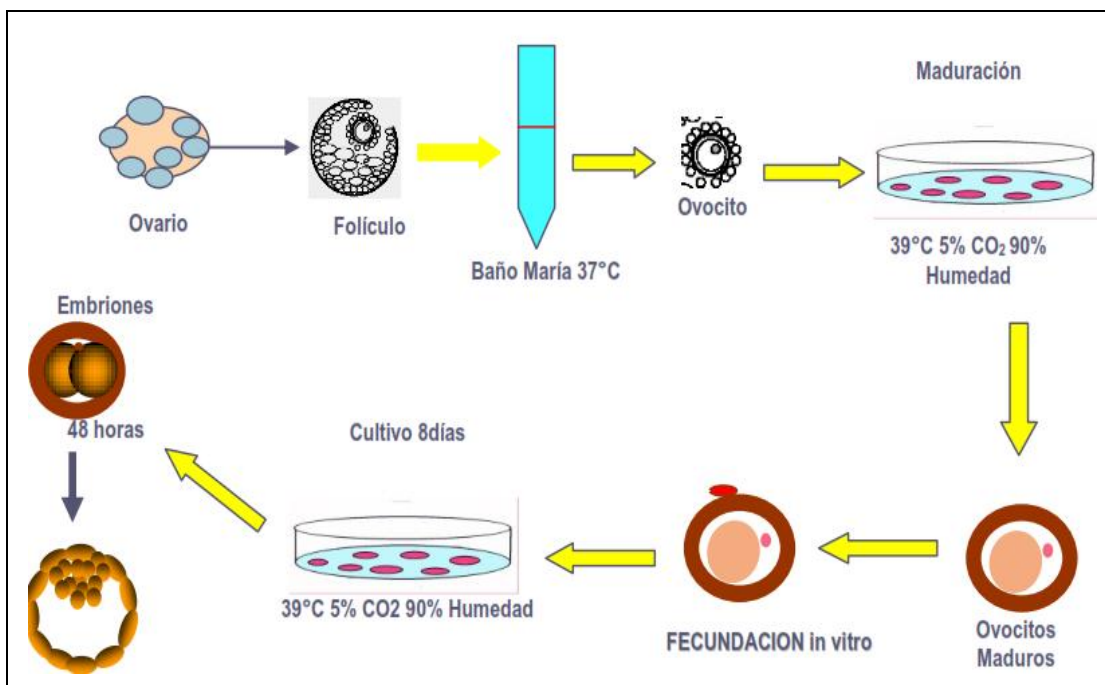
El lugar de la fecundación es la ampolla, una región ancha del oviducto. Para que ocurra la fecundación no deben existir obstáculos con el fin de que los dos gametos se encuentren en el oviducto (b)

1.3 Maduración y fertilización in vitro de ovocitos ovinos.

La maduración y fertilización in vitro nos brinda la posibilidad de incrementar los conocimientos básicos de los procesos fisiológicos involucrados, maduración del ovocito, fertilización, desarrollo de cigotos y desarrollo embrionario temprano.(5)

Gráfico N: 5

Modelo de Producción Embriones in vitro



Fuente: Revista Científica, Fertilización in vitro FCV – LUZ / VOL, III, N: 3, 1993

1.3.1 **Maduración in vitro de ovocitos ovinos.**

La maduración in vitro de los ovocitos requiere el cumplimiento de los siguientes pasos:

- La recolección de los ovarios en el matadero,
- Obtención de ovocitos,
- Selección de los ovocitos y
- Maduración in vitro de los ovocitos.

(o)

1.3.1.1 **Recolección de ovarios en matadero.**

La recuperación de ovarios en el matadero se realiza mediante la intervención del recolector en el inicio de la cadena de matanza. (9)

Los ovarios se obtienen de ovejas en diferentes estados fisiológicos dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales, los ovarios recogidos son colocados en un termo de transporte que contiene solución salina. (e)

El transporte de los ovarios al laboratorio, se realiza desde los 30 minutos después de la recolección. Hasta el presente se han descrito dos modalidades de mantenimiento de los ovarios durante la recuperación en el matadero y el transporte al laboratorio. (p)

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, los ovarios son mantenidos a 28-30°C. 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. (h)

Una vez en el laboratorio, los ovarios son lavados repetidas veces en la solución de transporte. Seguidamente, los ovocitos pueden ser recogidos inmediatamente, o bien, los ovarios son colocados y mantenidos en baño termostático a 30° C antes de proceder a la obtención de los ovocitos. (5)

El tiempo que media entre la obtención de los ovarios, el transporte al laboratorio a 30°C y la obtención de los ovocitos fue de 4h. De este modo, el tiempo en que los ovocitos son aspirados, tiene efectos positivos en la maduración in vitro de los ovocitos ovinos. (10)

1.3.1.2 **Obtención de los ovocitos.**

Los ovarios obtenidos en matadero proceden de ovejas de diferentes edades y condiciones fisiológicas. Estos ovarios presentan en su superficie una cantidad variable de estructuras: folículos, cuerpos lúteos, cuerpos hemorrágicos y cuerpos albicans. (q)

Los folículos se podrían clasificar en dos categorías:

- Folículos claros
- Folículos opacos.

En este estudio, se demuestra que los ovocitos provenientes de folículos claros muestran tasas de maduración in vitro significativamente superiores a los ovocitos provenientes de los folículos opacos. (7)

También puede establecerse, que los folículos claros tienen en su contenido menor concentración de estrógenos, progesterona y fluido folicular que los opacos. (g)

1.3.1.3 **Para la obtención de los ovocitos, se han descrito dos métodos:**

- El método de aspiración y
- El método de corte

(o)

1.3.1.3.1 **El método de aspiración**

Consiste en la succión de los folículos situados en la superficie del ovario por medio de una aguja. (r)

El diámetro de la aguja utilizada es considerado importante a efectos de no dañar los ovocitos recogidos, pero en caso de ovejas no es recomendable ya que luego de la aspiración de los folículos con la jeringa no se obtiene ovocitos a diferencia de otras especies que si se obtienen buenos resultados.(3)

1.3.1.3.2 El método de corte

Consiste en el corte de la superficie del ovario con una hoja de bisturí estéril, luego se procede a sacar folículo por folículo, para posteriormente en el estereomicroscopio proceder a romper con una aguja de jeringa para luego extraer el ovocito. (s)

Estudios comparativos realizados entre el método de corte y el método de aspiración obtienen un mayor número de ovocitos en promedio por el método de corte en comparación al método de aspiración. (r)

1.3.1.4 Selección de los ovocitos.

La morfología que presentan los ovocitos recogidos de los ovarios, nos brinda la posibilidad de predecir su capacidad de reiniciar la meiosis. Los ovocitos obtenidos en el laboratorio son clasificados y seleccionados para ser madurados in vitro, según el aspecto que presenta su citoplasma y las células del cúmulus que lo envuelven. (t)

1.3.1.5 Clasificación de acuerdo a las células del cúmulus y del ovoplasma.

1.3.1.5.1 Clasificación de acuerdo a las células del cúmulus.

Categoría 1. Presentan tres capas compactas de células del cúmulus que los rodean en toda su superficie; Categoría 2, Se presentan rodeados parcialmente por tres capas compactas de células de los cúmulus, Categoría 3. Se encuentran rodeados por células de los cúmulus expandidas, Categoría 4. Ovocitos denudados. (n)

1.3.1.5.2 Clasificación de acuerdo a las células del ovoplasma.

Categoría 1. Presentan ovoplasma granulado y homogéneo y que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida, Categoría 2. Presentan ovoplasma granulado no homogéneo, (periferia clara y centro oscuro) y que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida, Categoría 3. Presentan ovoplasma vacuolado, fragmentado y que no llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida. (u)

Aquellos ovocitos que con tres o más capas compactas de células del cúmulo que lo rodeen y ovoplasmas homogéneos, se clasifican como aptos y se seleccionan para maduración in vitro. (8)

Los primeros estudios realizados para la reanudación de la meiosis y conservar los ovocitos viables, tiene más de 50 años, después siguieron trabajos para fecundar los ovocitos con espermatozoides en forma “in vitro”. Sin embargo se demostró que la mayor parte de la fecundación “in vitro” realizada hasta entonces, no alcanzaba el desarrollo embriológico adecuado. (10)

1.3.1.6 Maduración in vitro de los ovocitos.

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

In vivo, la hormona FSH es responsable de la inducción de la maduración de los folículos y la hormona LH promueve la reanudación de la meiosis de los ovocitos. Las células del cúmulo también desempeñan un papel importante en la maduración de los ovocitos. Estas células aportan nutrientes y energía (piruvato) al ovocito (5).

1.3.2 Condiciones medioambientales para la maduración in vitro de los ovocitos.

A efectos de optimizar la maduración in vitro, es importante proveer al ovocito del medio ambiente adecuado que le permita generar los procesos biológicos necesarios (temperatura, presión osmótica, pH y atmósfera del incubador) para completar la maduración nuclear y citoplasmática (10)

1.3.2.1 Temperatura

La temperatura más adecuada para el cultivo in vitro de los ovocitos ovinos es de 39°C las temperaturas comprendidas entre 37°C y 41°C no perjudican con el proceso de maduración in vitro de los ovocitos. (l)

1.3.2.2 Presión Osmótica

La presión osmótica que deben tener los medios de maduración de ovocitos, oscila idealmente entre 265 y 325 mOsM. Los medios generalmente utilizados tienen osmolaridades cuyos valores oscilan entre 285 y 295 mOsM (h)

1.3.2.3 El pH

El pH óptimo en el medio de maduración debe mantenerse entre 7.2 y 7.4, El control del pH en el medio de maduración se realiza gracias a la concentración de CO₂ en la atmósfera del incubador, bicarbonato de sodio en el medio, u otro tipo de sustancias tampón adicionadas al medio de cultivo como las sales de Hepes (o)

1.3.2.4 Atmósfera gaseosa en el incubador

La composición de la atmósfera gaseosa en el incubador, se considera importante, en el control del pH intra y extracelular y por ende las funciones metabólicas de las células en cultivo (e)

Por ello habitualmente se emplean mezclas de gases a diferentes concentraciones

- 5% de CO₂ en el aire o bien, 5% CO₂
- 5% O₂
- 90% N₂

(p)

1.3.2. 5 **Tiempo requerido para la maduración in vitro de los ovocitos.**

El tiempo del cultivo requerido para la maduración in vitro de los ovocitos hasta alcanzar el estadio de metafase II en bovinos, es variable y según los diferentes autores este tiempo puede oscilar entre 20 y 28 horas. (r)

Durante este tiempo, los ovocitos bovinos experimentan una serie de cambios dentro de los cuales podemos citar la desaparición de la membrana nuclear. La extrusión del primer corpúsculo polar y la llegada al estadio de metafase II. (s)

El cúmulo oóforo, compacto en el inicio, comienza a expandirse por la presencia de ácido hialurónico en la matriz intercelular y se observa el efecto de mucificación del cúmulo (6)

1.3.2.6 **Criterios empleados para determinar la maduración.**

El ovocito maduro tiene una morfología y características definidas, generalmente aceptadas como criterios para evaluar la maduración in vitro, De este modo, consideramos maduros a aquellos ovocitos que presentan cúmulo mucificado y expandido, presencia del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino y metafase II. (i)

A pesar de ello, la capacidad de los ovocitos para ser fertilizados in vitro y continuar el desarrollo normal de los embriones, es probablemente el criterio más adecuado. (8)

1.4 Fertilización in vitro de ovocitos ovinos.

Finalizado el periodo de incubación in vitro, los ovocitos madurados se encuentran aptos para ser fertilizados in vitro. Tanto para condición in vivo como in vitro, previo a la fertilización de los ovocitos, el semen debe estar capacitado y activado. La capacitación y activación del espermatozoide, posibilitará a este progresar a través de las células del cúmulus y penetrar la zona pelúcida (10)

1.4.1 Preparación del semen de carnero

La preparación del semen de carnero congelado, incluye el lavado de las células espermáticas de los componentes del diluyente y crioprotectores, la separación de los espermatozoides motiles de los no motiles y la capacitación (s)

1.4.1.1 Lavado del semen y separación de espermatozoides motiles y no motiles.

Al menos cinco metodologías han sido descritas para la separación de los componentes del diluyente seminal de las células espermáticas y su selección.

Estas son:

- Lavado por centrifugación
- Gradiente de percoll,
- Filtración en columna con lana de vidrio
- Migración sedimentación.

(i)

El lavado por centrifugación resulta ser el método más sencillo de todos. El semen se centrifuga 2 veces a 500g durante 5 a 10 minutos, la centrifugación excesiva del semen congelado provoca alteraciones en la membrana plasmática. (9)

El percoll, el sistema de separación de espermatozoides consiste en la colocación, en un tubo estéril, de 2 gradientes de percoll (55% y 90%) diluido en medio de cultivo Sperm TALP. El semen se siembra en la parte superior del tubo y se centrifuga a 200g durante 25 minutos a temperatura ambiente. (t)

El método de filtración en columna con lana de vidrio consiste en la separación de células espermáticas basado en la motilidad de los espermatozoides. La muestra de semen se coloca en la parte superior de un tubo cilíndrico de 10 a 15 cm de altura. Los espermatozoides motiles atraviesan la lana de vidrio y se recogen en el fondo del tubo. (w)

1.5 Cocultivo de los ovocitos con las células espermáticas.

Una vez que los espermatozoides han sido lavados, seleccionados y capacitados, se realiza el cocultivo de estos con los ovocitos madurados in vitro (z)

1.6 Condiciones medioambientales para el cocultivo in vitro de los ovocitos y los espermatozoides.

Durante el cocultivo de los ovocitos con el semen, las condiciones medioambientales son similares a las de maduración in vitro. La temperatura debe mantenerse a 39°C con oscilaciones no superiores a 0.5°C. (u)

La concentración de CO₂ en aire al 5%, es esencial para mantener el pH del medio de fertilización en niveles de 7.4 a 7.8 y la humedad relativa debe ser superior al 99%. (v)

1.7 Criterios empleados para determinar la fertilización.

En general, se considera fertilizado a aquel ovocito que ha emitido el segundo corpúsculo polar y se visualizan los pronúcleos masculino y femenino y la cola espermática. Sin embargo, no siempre es posible la visualización de todas las estructuras y se propone la formación de las primeras blastómeras como criterio (x)

En la actualidad, la utilización de sistemas de cocultivo in vitro de cigotos con células de la granulosa u oviductales. La utilización de medios de desarrollo in vitro sintéticos, permite obtener embriones en estadios avanzados del desarrollo (mórulas, blastocistos). (9)

Ello, posibilita la congelación y transferencia a las hembras receptoras por métodos no quirúrgicos. De este modo, los intentos por continuar el proceso gestacional in vivo, de los embriones producidos por fertilización in vitro, permiten la utilización de esta tecnología en la industria de las transferencias embrionarias. (y)

1.8 Efecto negativo y un efecto positivo, sobre el desarrollo del embrión.

El efecto negativo viene determinado por la modificación en la concentración de ciertos constituyentes esenciales, para el desarrollo in vitro del embrión por parte de las células somáticas (m)

Por otra parte, el efecto positivo radicaría en que las células somáticas producen y liberan ciertos factores de crecimiento que contribuyen al desarrollo del embrión. (9)

1.8.1 Condiciones medioambientales para el cultivo in vitro de los cigotos y embriones ovinos.

Las condiciones medioambientales (temperatura, atmósfera gaseosa, pH y osmolaridad) para el cultivo in vitro de los cigotos y embriones son consideradas importantes, para el normal desarrollo en la especie ovina, (z)

La temperatura óptima para el adecuado desarrollo in vitro es de 39°C. La concentración del 5% de CO₂ en aire, permite mantener el pH del medio de desarrollo a 7.2 o 7.4 y la osmolaridad debe variar en valores comprendidos entre 260 y 300 mOsM. (u)

CAPÍTULO II

2 MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se detalla la ubicación geográfica en donde se realiza el estudio, los materiales utilizados para su ejecución, la metodología y los pasos empleados para la realización de la técnica.

2.1 Características del lugar

2.1.1 Situación política

- **Provincia:** Cotopaxi.
- **Cantón:** Latacunga.
- **Parroquia:** Eloy Alfaro.
- **Barrio:** Salache Bajo.

2.1.2 Situación geográfica

- **Latitud:** 00° 59'47.68"S.
- **Longitud:** 78° 31'19.16"W.
- **Altitud:** 2757.591 m.s.n.m.

2.1.3 Datos meteorológicos

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

Fuente: registro administrativo CEYPSA

2.2 Materiales

2.2.1 Unidad de Estudio

La investigación se realizó con 60 ovocitos calificados, obtenidos de ovarios en el camal de Saquisilí y testículos de un carnero adulto, obtenido del criadero de ovinos sol y luna de la provincia de Cotopaxi, Cantón Pujilí.

2.2.2 Materiales de oficina

- Papel bond
- CDs.
- Libreta
- Copias
- Anillados
- Empastados
- Impresiones

2.2.3 Recursos tecnológicos

- Calculadora
- Cámara fotográfica
- Flash memore
- Internet

2.2.4 Materiales de laboratorio

- Desinfectantes y Antisépticos
- Jeringas
- Fundas herméticas
- Porta y cubre objetos
- Guantes
- Mandil
- Ropa quirúrgica
- Micropipetas
- Puntas desechables para micropipetas

- Cajas Petri
- Tubos graduados
- Tubos vacumtainer
- Pajuelas de 0.25
- Termo de nitrógeno líquido
- Tapones de pajuelas
- Bisturíes

2.2.5 Equipos de Laboratorio

- Cámara flujo laminar
- Estéreo microscopio
- Centrifuga
- Termocuplex
- Baño maría

2.2.6 Sustancias

- Agua destilada
- Nitrógeno líquido
- Refrigerante holding
- Medio de maduración para FIV progest
- Aceite mineral
- Percol
- Andromed
- Heparina
- Medio de cultivo

2.2.7 Materiales de Campo

- Overol
- Botas
- Contenedores para transporte de material biológico

2.2.8 Material biológico

- Testículo de carnero
- Ovarios de ovejas
- Baño maría

2.3 Características de los Equipos Utilizados

2.3.1 Baño maría

2.3.1.1 Descripción General

Los baños de María, son equipos de uso frecuente en el Laboratorio Clínico, ya que en las reacciones químicas la temperatura es un factor importante.

Por regla general se utilizan 37°C para reacciones enzimáticas: Estas tienen la función de llevar y mantener una muestra a una temperatura específica en el laboratorio médico tienen muchas aplicaciones tales como activar procesos enzimáticos o proporcionar condiciones óptimas para cultivos (a 56°C en serología y en algunas pruebas a 100°C para acelerar las reacciones).

Se pueden clasificar por tamaño en grande, mediano y pequeño. Los baños de María, incluyen termostatos desde 25°C hasta 100°C, los más recientes traen incorporados, bombas de circulación de agua que permiten mantener la temperatura uniforme.

Los baños de maría secos, son bloques de calentamiento a temperaturas prefijadas incluidos dentro de equipos.

El gabinete es el pozo donde se deposita el agua y todo el resto del chasis. Las dimensiones del pozo son las que van a determinar el tamaño del equipo

Por lo general su construcción es de acero inoxidable o un material muy resistente a las oxidaciones. (v)

2.3.2 Centrifuga

2.3.2.1 Características Generales

Equipado con tubo de plástico adaptadores de tamaño 17x90 mm, apto para 15 ml tubos de centrífuga, puede manejar 16x98 mm y 13x100 mm tubos de ensayos.

La unidad viene con la versátil capacidad de 45° fijomotor de ángulo. Operación de control de Velocidad Variable, a sólo el tiempo de funcionamiento desde o hasta 30 minutos.

Sistema de equilibrado automático para eliminar la vibración. (w)

2.3.3 Estéreo microscopio

Posee una alta proporción de zoom y aumento, el SMZ745 le ofrece una distancia de trabajo impresionante de 115mm, dándole espacio suficiente para la fabricación y manipulación en la muestra.

2.3.3.1 Diseño:

Su diseño robusto y durable se adapta a una gran variedad de aplicaciones y ámbitos.

El SMZ-745T le ofrece protección ESD para evitar que las muestras sean dañadas por la descarga electrostática.

Además, el diseño contra hongo en el interior del cuerpo zoom, permite que el microscopio se pueda usar en ambientes donde la temperatura y la humedad son altas.

El cuerpo del zoom está equipado con un puerto de cámara (tipo trinocular) y un adaptador incorporado 0.55x con montura C. Esto permite el montaje directo de cualquier cámara digital de la serie DS de Nikon y simplifica el proceso para generar imágenes digitales, captura de imagen y la observación en un monitor.

Adicionalmente, el SMZ745T incorpora una palanca de cambio de trayectoria óptica que facilita el cambio entre un ocular y una cámara. (NIKON) (x)

2.3.4 Cámara flujo laminar

La cámara flujo laminar Aura HZ pueden ser usadas para una amplia variedad de aplicaciones que incluyen: laboratorios de fertilidad, cultivo celular, biología molecular, preparación de drogas, PCR (en modo activo con opción de tiempo y luz UV), industria de alimentos.

El diseño interno de la AURA HZ garantiza el más alto desempeño y los más altos niveles de seguridad.

2.3.4.1 Características Generales:

Control de aire automático: La Aura HZ es una cabina de flujo laminar horizontal, Clase 100, para protección al producto de la contaminación externa y contaminación cruzada dentro de la cámara de trabajo.

La velocidad de aire es permanentemente controlada para conseguir la seguridad más alta del producto.

2.3.4.2 Modo de operación:

El flujo de aire a partir de los filtros es de velocidad constante, produce un ambiente extremadamente limpio mejor que la clase 100 en el área de trabajo, previniendo cualquier contaminación a partir del ambiente exterior.

Pre filtros de poliuretano lavables para remover las partículas gruesas antes de que el aire alcance filtro H14.

Filtros clase H14 de alta eficiencia garantizados con el 99,999% de eficiencia sobre partículas de 0,3 micrones (EN 1822-1 y en 13091:1999 probadas y certificadas).

Control electrónico de la velocidad de aire: el promedio volumétrico del flujo de aire es monitoreado vía anemómetro vane integral y controlado por un microprocesador.

La velocidad promedio es mantenida en el rango de 0,5m/seg+/-20.

Suave teclado digital sobre el panel para control de luz, ventilador, luz ultravioleta.

Alarmas visibles y acústicas para alertar sobre la velocidad del aire y obstrucción de filtros. Agujeros prefabricados para fácil conexión de las opciones posteriores.

Paneles laterales en vidrio templado.

Membrana micro porosa sobre los filtros HEPA en la superficie inferior para perfecta distribución de la velocidad del aire.

Operación quieta y silenciosa menor a 59 dB (A) debido a la suspensión del ventilador libre de vibración. (y)

2.3.5 Micropipetas.

2.3.5.1 Descripción del equipo:

La micropipeta es un instrumento de laboratorio empleado para absorber y transferir pequeños volúmenes de líquidos y permitir su manejo en las distintas técnicas, científicas.

Es de destacar que el uso de micropipetas permite emplear distintos líquidos sin tener que lavar el aparato: para ello, se emplean puntas desechables, de plástico, que habitualmente son estériles.

Existen varios tipos de puntas: por ejemplo, las amarillas para pipetear volúmenes pequeños (por ejemplo, 10 µl), y las azules para pipetear volúmenes grandes (por ejemplo, 800 µl). (u)

2.3.6 Suero Fisiológico

Es una solución para el tratamiento del desequilibrio hidroelectrolítico donde se incluyen el cloro y el sodio; tratamiento de la deshidratación; como vehículo para fármacos inyectables.

La concentración y tonicidad de la solución de cloruro de sodio, determinan su utilidad en diferentes cuadros. (z)

2.4 Métodos y Técnicas

2.4.1 Método estadístico.

La investigación es de tipo descriptiva y no experimental ya que se obtuvieron datos de acuerdo a la investigación, se aplicó un protocolo establecido para la fertilización in vitro en esta especie.

2.4.2 Investigación descriptiva

Describe los datos y características de la población o fenómeno en estudio, en este caso la producción de embriones en ovinos.

También nos permite describir los cambios como en nuestro caso, que por el alto costo de los equipos o por daños en la cámara del CO₂, se puede remplazar con un equipo de baño maría y el cilindro que contenga los gases necesarios (N₂, O₂, CO₂).

2.4.3 Investigación no experimental

En la técnica que utilizamos en nuestra investigación **Submarine Incubation System** nos posibilita examinar el comportamiento, para la cual se describirán los parámetros mediante tablas, cuadros, barras, etc

2.5 Metodología

En esta esta investigación no se hace variar intencionalmente las variables independientes, en la investigación no experimental es observar fenómenos tal y como se dan en su contexto natural, para después analizarlos.

Este método no especifica la naturaleza de las comparaciones que habrían de efectuarse, constituyendo además el plan general del investigador para obtener respuestas a sus interrogantes o comprobar las hipótesis de investigación.

2.6 Técnica de Investigación

El presente estudio de fertilización in vitro de embriones en ovinos lo realizamos en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Nuestra técnica fue la observación como base fundamental para analizar los procesos e interpretar los resultados.

Se utilizó 12 ovarios provenientes de 6 ovejas adultas, sacrificadas en el camal de Saquisili y un testículo que se obtuvo en el criadero de ovejas de sol y luna ubicado en el canton pujili.

2.6.1 Metodología, Práctica empleada

- Transporte de Ovarios
- Preparación de Laboratorio
- Desarrollo de la práctica

2.6.2 Transporte de Ovarios

Utilizamos 50 ovarios provenientes de 6 ovejas (*ovis orientalis aries*), sacrificadas en el matadero del camal de Saquisili, ubicado en la ciudad de Saquisili, Cotopaxi, Ecuador.

Los 50 ovarios se obtuvieron en la madrugada del día jueves 26 de diciembre del 2013 el transcurso de tres horas, de 25 ovejas sacrificadas en dicho camal

Luego, se seccionan los ovarios del tracto reproductor femenino se colocó en un recipiente de vidrio de boca ancha que contiene solución fisiológica.

Seguidamente, se transportan hasta el laboratorio Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Cotopaxi” dentro de los 30 minutos posteriores.

2.6.3 Preparación del laboratorio

En el laboratorio se preparó todos los materiales que se utilizaron, verificando que se encuentren limpios y desinfectados, al igual que el medio donde se desarrolló el experimento, aplicando correctamente el protocolo de bioseguridad establecido.

2.6.4 Desarrollo de la práctica

Una vez colectados los ovocitos y espermatozoides se siguieron los siguientes pasos en el laboratorio.

Aplicando la Técnica de **Submarin Encubation System**.

- Maduración in vitro de ovocitos
- Capacitación espermática
- Fertilización de ovocitos
- Crioconservación de los embriones

2.6.5 Maduración in vitro de ovocitos

Para la maduración in vitro de los ovocitos se necesitan dos etapas:

2.6.6 Obtención de los ovocitos por el método de corte

De los ovarios recuperados en el matadero, en el laboratorio obtenemos 90 ovocitos por el método de corte

El método de corte consiste en el corte de la superficie del ovario con una hoja de bisturí estéril, luego se procede a sacar folículo por folículo, para posteriormente en el microscopio estereoscópico proceder a romper con dos aguja 21x ½, unida a cada jeringa de 5 ml y se coloca en placas de cultivo estériles, desechables, de 60 mm el mismo con el contenido de holding plus.

En un microscopio estereoscópico utilizando una micropipeta se procedió a la captación del ovocito y se colocó en una caja petri que contiene micro gotas de holdíng plus

Esta técnica se utilizó en todos los folículos y de esta manera se realizó con todos y cada uno de los folículos para obtener los ovocitos de buena y mala calidad.

Una vez obtenidos los ovocitos, se seleccionan bajo microscopio estereoscópico, evaluando su apariencia general, citoplasma y células del cúmulo que los rodean.

2.6.7 Clasificación de los ovocitos:

Mediante el estéreo microscopio identificamos la presencia de un promedio de 1 a 2 ovocitos en cada ovario de distinta calidad tomando el valor mínimo de 1.8 ovocitos de cada ovario, obteniendo un total de 90. Clasificándolos en tipos A, B y C.

- **Tipo A:** Corresponde a un ovocito con células del Cumulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente.
- **Tipo B:** Tiene capas múltiples del cumulas (De 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras.

- **Tipo C:** Se caracteriza por poseer un Cumulus denudado y un citoplasma irregular con zonas oscuras.

En la cámara flujo laminar mediante el estéreo microscopio. Una vez realizado tres lavados de los ovocitos en holding, categorizamos los mismos. Dando como resultado:

- **Tipo A: 60**
- **Tipo B: 24**
- **Tipo C: 6**

De los cuales utilizamos los de tipo A un total de 60 ovocitos clasificados.

En una caja petri colocamos una gota de aceite mineral y una gota de medio de maduración en el cual colocamos los ovocitos para su maduración.

Colocamos las cajas petri dentro de una funda hermética acompañada de una caja petri de agua, con el fin de proveer humedad.

Luego se llenó la funda de gas que contiene el 5% de Dióxido de Carbono, 5% de Oxígeno y un balance de Nitrógeno, para la maduración de los ovocitos.

Ya sellada la funda se colocó a baño maría con una temperatura de 38.3°C, por 24 horas.

2.6.8 Cultivo *in vitro* de ovocitos.

El cultivo *in vitro* de los 60 ovocitos seleccionados como aptos para el cultivo, se realiza en microgotas.

Obtenido todos los ovocitos de buena calidad en una caja petri con holdíng se procedió a lavar tres veces por medio de la visualización con la ayuda del microscopio estereoscopio. Esto se realiza siempre dentro de la cámara de flujo laminar

La caja petri con la solución y conjuntamente con los ovocitos de buena calidad se colocó dentro de una funda de celofán con una mezcla de gases distribuidos en diferentes porcentajes y se ingresó a la máquina de baño maría a la temperatura de 38.5°C.

Para su maduración de los ovocitos, se debe esperar 24 horas para que cumpla todo proceso y de esta manera obtener ovocito maduros de calidad .

2.6.8.1 **Segundo día:** después de 24 horas de haber cumplido dentro de la máquina de baño maría se procedió a sacar de dicha maquina cuidadosamente, lo trasladamos las muestras a la cámara de flujo laminar.

Luego se observaron las muestras mediante el microscopio estereoscópico y se analizó el proceso de cambios que se habían obtenido dentro de las 24 horas de maduración.

Mediante el microscopio estereoscópico se procedió a observar a los ovocitos maduros y realizar el respectivo desnudamiento, mediante una manipulación con micropipetas.

Aquellos ovocitos que presenten el primer corpúsculo polar y se encuentren en estadio de metafase II, se consideran madurados.

2.7 **Capacitación Espermiática**

Se utilizan un testículo de un carnero que se procedió a castrar pertenecientes al carnero de nombre “Investor” de la especie *ovis orientalis aries*, que se encontraba en el criadero de ovinos sol y luna ubicado en el cantón Pujili el día viernes 27 de diciembre del 2013 a las 12 horas, segundo día del experimento .

Para ello se utilizó mandil, guantes, bisturí, suero fisiológico, un frasco de boca ancha.

Para la obtención de los espermatozoides aplicamos la técnica de Slainsin Epidídium, Realizamos una incisión en la cola del epidídimo, lavamos con una dilución de 1 ml de andromed y 4 ml de agua bidestilada a una temperatura de 35°C sobre una caja petri.

Colocamos en un tubo vacumtainer la solución del lavado de los espermatozoides y centrifugamos por 5 minutos.

Una vez terminada la centrifugación extraemos con una pipeta el pellet de espermatozoides que se formaron el tubo, trasladándolo a otro tubo que contenga 1 ml de percol y centrifugamos una vez más por 3 minutos, para limpiar los espermatozoides.

Retiramos el tubo de la centrifuga y colocamos los espermatozoides en una caja petri que contiene una gota de heparina para la capacitación espermática, luego la colocamos sobre la Termocuplex para que se mantenga a una temperatura de 38.5 °C la misma de los ovocitos.

2.8 Fertilización de los ovocitos

Cuando ya está listo los espermatozoides retiramos del baño maría los ovocitos en maduración, verificamos la maduración de todos los ovocitos, realizamos 3 lavados en medio de cultivo, luego colocamos los ovocitos madurados en una caja petri con aceite mineral y una gota grande de medio de cultivo, con una pipeta colocamos cuidadosamente los espermatozoides.

Colocamos las cajas petri dentro de una funda hermética acompañada de una caja petri de agua, con el fin de proveer humedad, luego llenamos las fundas con el gas mencionado, sellamos e introducimos nuevamente en la maquina a baño maría por 24 horas a una temperatura de 38.3°C.

2.9 Crio conservación de los embriones

Luego de las 24 horas retiramos la funda que contiene las cajas petri del baño maría, mediante estéreo microscopio verificamos la presencia de embriones.

Aplicamos una gota de medio de cultivo en una caja petri sobre la termocuplex a una temperatura de 38.3°C en la cual seleccionamos los embriones.

En otra caja petri realizamos la valoración y selección de los embriones en 4 gotas de holding teniendo como resultado 20 embriones de buena calidad. Con una pipeta colocamos etilenglicol a los embriones seleccionados para luego colocarlos en pajuelas de 0.25, congelarlos y conservar en el termo de nitrógeno líquido.

CAPÍTULO III

3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El presente capítulo se detalla los resultados obtenidos durante la realización de la investigación.

Evalúamos, 50 ovarios de ovejas adultas y 1 testículo. Donde obtuvimos los siguientes resultados.

3.1 Resultados

3.2 Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos.

La maduración *in vitro* de ovocitos comprende la medición y el análisis de variables en 2 etapas; la obtención y clasificación de ovocitos y el cultivo *in vitro* de ovocitos y fertilización *in vitro* de ovocitos.

3.2.1 Obtención y clasificación de ovocitos

Como se detalla en la **grafico 1**, sobre un total de 50 ovarios recolectados (OVR) se obtuvieron 90 ovocitos de los cuales 60 fueron clasificados como aptos (OVA) y 30 como no aptos (OVNA) para ser madurados *in vitro*.

- ❖ Número de ovarios colectados: 50 unidades
- ❖ Cantidad de ovocitos colectados: 90 unidades
- ❖ Calidad de ovocitos:
 - **Tipo A: 60**
 - **Tipo B: 24**
 - **Tipo C: 6**
- ❖ Porcentaje de ovocitos maduros: 66.66%
- ❖ Número de embriones obtenidos: 20 unidades

Cuadro N. 2

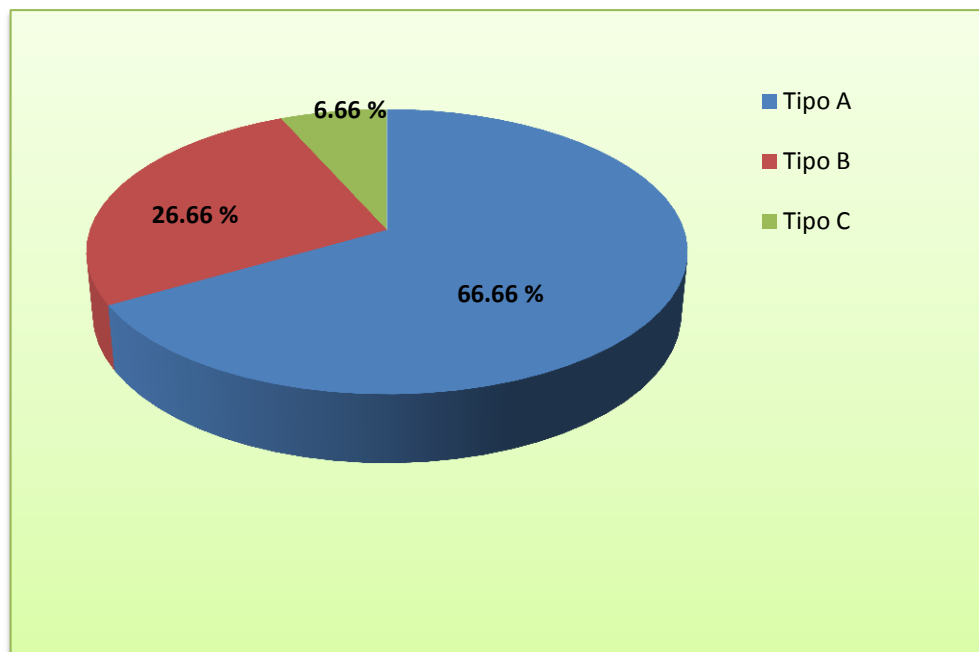
Número de Ovocitos Recolectados

	Ovarios	Ovocitos	Tipo A	Tipo B	Tipo C
Cantidad	50	90	60	24	6

Elaborado por: Edwin Jaya, Freddy Sangoquiza. Año 2014

Gráfico N.- 6

Número de Ovocitos Recolectados



Elaborado por: Edwin Jaya, Freddy Sangoquiza. Año 2014

Como se demuestra en el **Cuadro N. 1**, se observa que se ha obtenido de un total de 50 ovarios la cantidad de 90 ovocitos distribuidos en Tipo A 60, Tipo B 24 y Tipo C 6.

Cuadro N.-3

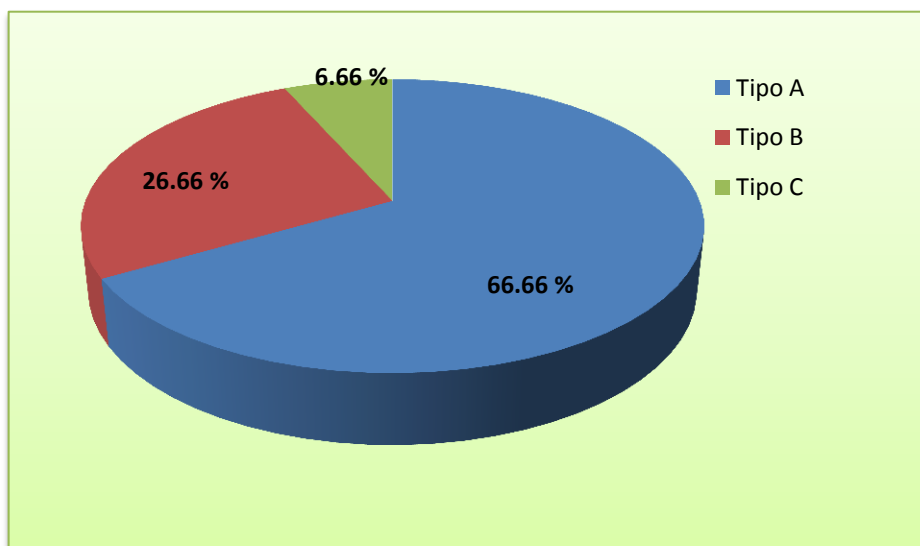
Porcentajes de Ovocitos Recolectados

	Ovocitos	Tipo A	Tipo B	Tipo C
Porcentaje (%)	100	66.66	26.66	6.66

Elaborado por: Edwin Jaya, Freddy Sangoquiza. Año 2014

Gráfico N.- 7

Porcentaje de Ovocitos Recolectados



Elaborado por: Edwin Jaya, Freddy Sangoquiza. Año 2014

Se demuestra en el **Cuadro N.-2**, al hacer un análisis porcentual se ha obtenido un porcentaje de ovocitos de Tipo A 66.66%, Tipo B 26.66% y Tipo C 6.66%.

3.2.2 Ovocitos Madurados

Basados en esta metodología, hemos seleccionado como aptos para la maduración *in vitro*, 60 ovocitos que presentan tres o más estratos compactos de células del cúmulus que lo rodeen y ovoplasmas homogéneos.

Por el contrario, hemos seleccionado como no aptos y descartados para la maduración *in vitro*, 30 ovocitos que se presentan rodeados por menos de tres estratos de células del cúmulus, cúmulus no compacto y ovoplasmas heterogéneos o picnóticos.

Cuadro N.-4

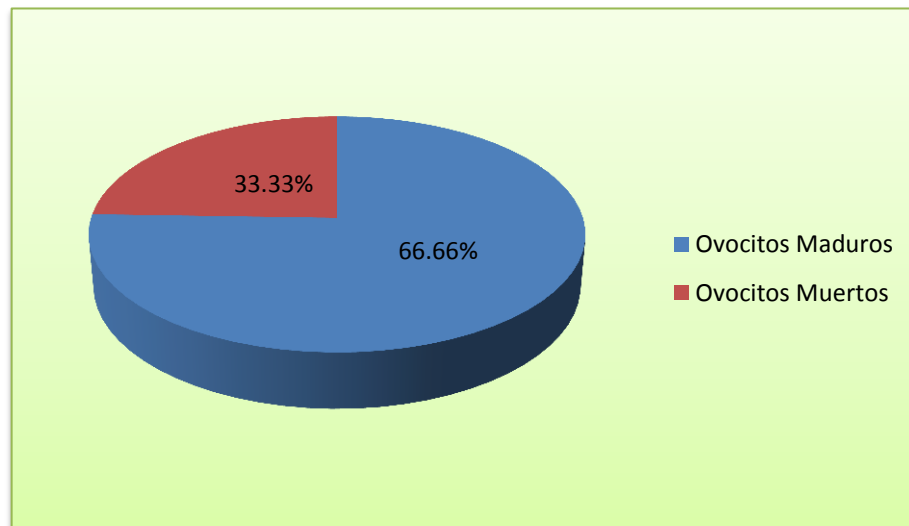
Porcentajes de Ovocitos Madurados

	Ovocitos	Ovocitos Maduros	Ovocitos Muertos
Tipo A	60	40	20
Tipo A (%)	100	66.66	33.33

Elaborado por: Edwin Jaya, Freddy Sangoquiza. Año 2014

Gráfico N.- 8

Porcentajes de Ovocitos Madurados



Elaborado por: Edwin Jaya, Freddy Sangoquiza. Año 2014

En el **Gráfico N.- 3** podemos observar a los ovocitos de Tipo A que sometimos a maduración de los 60 de tipo A obtuvimos que; 40 corresponden al 66.66% maduraron, mientras que 20 de los ovocitos que corresponde al 33.33% no maduraron.

3.2.3 Fertilización de Ovocitos

Cuadro N.-5

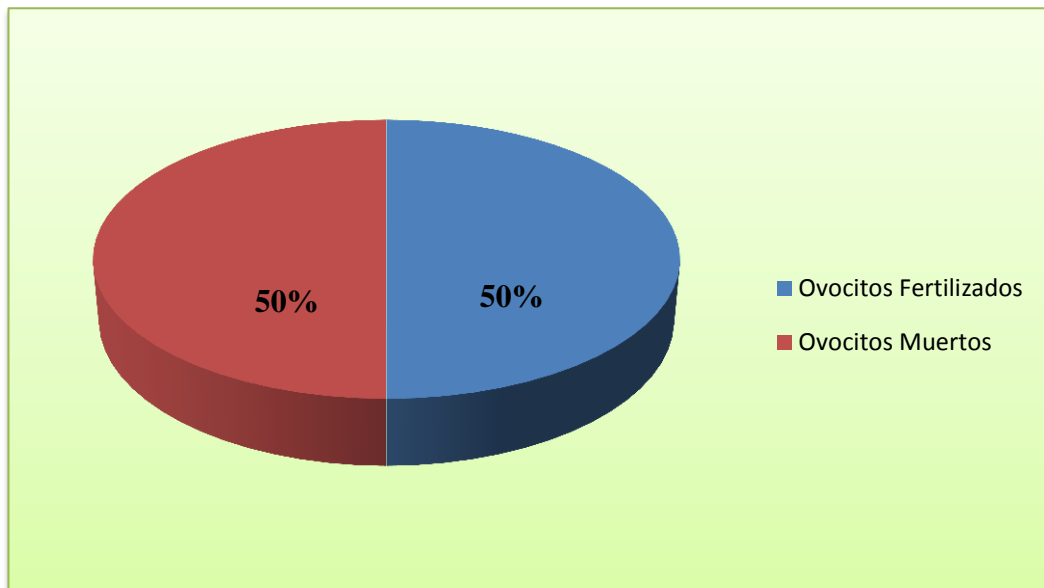
Fertilización de Ovocitos Maduros

	Ovocitos Maduros	Ovocitos Fertilizados	Ovocitos Muertos
Tipo A	40	20	20
Tipo A (%)	100	50	50

Elaborado por: Edwin Jaya, Freddy Sangoquiza. Año 2014

Gráfico N.- 9

Fertilización de Ovocitos Maduros



Elaborado por: Edwin Jaya, Freddy Sangoquiza. Año 2014

En el gráfico **Gráfico N.- 4**, se demuestra a los 40 ovocitos maduros que corresponde al 100% que sometimos a fertilización, obtuvimos que; 20 que corresponden al 50% fertilizaron hasta convertirse en embriones, mientras que 20 de ellos que corresponde al 50% no fertilizaron.

CONCLUSIONES

- Aplicando la Técnica de **Submarin Encubation System** evidencia con claridad, que los embriones ovinos son cultivados adecuadamente
- En el presente estudio, el número ovocitos aptos por ovario fue 1.2 y el número de ovocitos no aptos fue 1.66 por ovario, para ser madurados *in vitro*
- Los elevados índices de maduración y fertilización *in vitro* de los ovocitos seleccionados demuestran que los medios y las condiciones de cultivo utilizados en el presente estudio, son aptos y proveen las condiciones necesarias para el cumplimiento de los procesos fisiológicos requeridos.
- La relación existente entre los ovocitos aptos y no aptos por ovario obtenido, está directamente relacionada con las tres variables involucradas: recolección y transporte de los ovarios, métodos e instrumental empleados para la obtención de los ovocitos y el correcto criterio empleado para su selección.
- En este sentido, el entrenamiento adecuado del operador y calidad y procedencia del material originario (ovarios) son importantes a la hora de evaluar resultados.
- Está claramente establecido que el medio de cultivo empleado para la maduración *in vitro* de los ovocitos, influye significativamente en las tasas de fertilización *in vitro*.
- En este sentido, el entrenamiento adecuado del operador y calidad y procedencia del material originario (ovarios) son importantes a la hora de evaluar resultados.

RECOMENDACIONES.

- Al iniciar la investigación es prioritario e importante seguir a pie de letra el protocolo de fertilización in vitro de ovocitos en ovejas para llegar a tener buenos resultados.
- Para la utilización de esta técnica es recomendable que los componentes del gas deben tener la concentración adecuada, con el fin de conseguir el ambiente necesario para la maduración y fertilización de los ovocitos.
- La desinfección general del laboratorio es fundamental para evitar algún tipo de contaminación.
- Se recomienda suministrar lo óptimo de temperatura a la incubadora para obtener buenos resultados
- En el momento de la fertilización se recomienda utilizar semen de buena calidad, para obtener un mayor número de ovocitos fertilizados y por ende mayor número de embriones.
- En nuestra investigación utilizamos la técnica de **Submarin Encubation System y**, se recomienda hacer estudios en la **cámara de CO2** y así se pueda evaluar mejores resultados.

BIBLIOGRAFÍA

CITAS BIBLIOGRÁFICAS DE LIBROS:

- 1) DURAN Felipe; 2005; Manual de explotación y reproducción en ovejas y borregos; pg. 214; primera edición; ISBN: 978-958-8203-39-3.
- 2) SISSON S. – GRASSMAN JD; 1982; Anatomía de los animales domésticos; tomo I, quinta edición; ISBN: 84-345-1609-8.
- 3) E.S.E Hafez-B. Hafez; 2000; Reproducción e inseminación artificial en animales, pg. 28; séptima edición, ISBN: 970-10-3719-7
- 4) E.S.E Hafez-B. Hafez; 2000; Reproducción e inseminación artificial en animales, pg. 179; séptima edición, ISBN: 970-10-3719-7
- 5) DURAN Felipe; 2005; Manual de explotación y reproducción en ovejas y borregos; pg. 223-224; primera edición; ISBN: 978-958-8203-39-3.
- 6) DURAN Felipe; 2005; Manual de explotación y reproducción en ovejas y borregos; pg. 223-224; primera edición; ISBN: 978-958-8203-39-3.
- 7) E.S.E Hafez-B. Hafez; 2000; Reproducción e inseminación artificial en animales, pg. 181; séptima edición, ISBN: 970-10-3719-7
- 8) IVAN Albarán 2002; Reproducción de Animales Domésticos pg.101; segunda edición, ISBN: 959-258-60C)
- 9) GIOVAMBATTISTA Guillermo, 2010; Genética de animales domésticos pg.253; primera edición, ISBN: 978-950-555.378-5
- 10) E. Melliso , 2010; Manual de reproducción animal; pg 16 primera edición , ISBN 996-958-8203-39-7

CITAS BIBLIOGRÁFICAS DE INTERNET:

- a) DURAN Felipe, **Aparato reproductor de la hembra**, <http://www.plusformacion.com/Recursos/r/Curso-para-formacion-practicos-inseminadores>, en línea, hora 10 am, fecha 15-06-2013.
- b) REGUEIRO Mariel, **Fisiología y Reproducción**, <http://www.mvzunipaz.edu.co/documentos/bloques/morfodinamica/charlas/aparatoreproductor-animales.pdf>, en línea, hora 16:12 pm, fecha 19-06-2013.
- c) UGA,L.**Reproduccion**,<http://www.agro.uba.ar/users/catala/C11%20Biotecnologia%20de%20la%20reproduccion%20animal.pdf>
- d) INEA Escuela Universitaria Ingeniería Técnica Agrícola, **Aparato reproductor,de,la,hembra**,http://legado.inea.org/web/zootecnia/Zootecnia/Reprod_hembra_archivos/ap_reproduc_cervix.htm... 4, en línea, hora 4 pm, fecha 15-06-2013.
- e) REGUEIRO Mariel, **Aparato reproductor de animales**, <http://www.mvzunipaz.edu.co/documentos/bloques/morfodinamica/charlas/aparato-reproductor-animales.pdf>, en línea, hora 16:30 pm, fecha 19-06-2013.
- f) FEDERICO,Hamann,**Regulacion,Hormonal**,http://legado.inea.org/web/zootecnia/Zootecnia/Hormonas_hembra.htm en línea, hora 13 am, fecha 09-06-2013.
- g) LOPEZ Oscar, **Ciclo estral ovejas y cabras**, <http://es.scribd.com/doc./78889575/Ciclo-Estral-Ovejas-y-Cabras>, en línea, hora 18:06 pm, fecha 21-06-2013.

- h) MUNDOpecuario,**Reproducción.animal**,http://mundopecuario.com/tema167/pubertad/ciclo_estrual-821.html, en línea, hora 11 am, fecha 08-06-2013.
- i) HAMANN Federico, **Esquema de la regulación hormonal en la hembra**,
http://legado.inea.org/web/zootecnia/Zootecnia/Hormonas_hembra.htm
en línea, hora 11 am, fecha 08-06-2013.
- j) FUENTE:L,**Fisiología,Reproductiva**,http://legado.inea.org/web/zootecnia/Zootecnia/Hormonas_hembra.htm en línea, hora 11 am, fecha 08-06-2013.
- k) BARRIOS.Camilo,**ovogénesis**,http://www.asoovinos.org/archivos/articulos_tecnicos/manual_cria_ovinos_produccion_carne.pdf,hora 13 pm, fecha 26-05-2013.
- l) HAMANN,Federico,**Ovogénesis**,<http://rbastom08.blogspot.com/2010/09/gametogenesis-o-formacion-de-gametos.html> , hora 20 pm, fecha 02-06-2013.
- m) ECIMER, **Gametogénesis**, <http://www.esimer.com/ovogenesis-espermatogenesis.php>, en línea, hora 10 am, fecha 08-06-2013.
- n) GONZALES,Rumualdo;**Fertilizacion,in,vitro**.http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/tecnicas-fertilizacion-in-vitro-oocitos-ovinos.html.en línea, hora 12 fecha 04 – 03 – 2013.
- o) Revista Científica, **Fertilizacion,in,vitro** FCV – LUZ / VOL, III, N: 3, 1993.en línea, hora 10 , fecha 04-07-2013

- p) PALOMINO Hector; 2006; **Biología del trasplante y manipulación de embriones**; http://bvs.minsa.gob.pe/local%20/Biblio/PLM/src/productos/35563_91.htm .en línea, hora 16 fecha 04 – 04 – 2013.
- q) RUMELA, N, **soluciones y mezclas**, <http://www.rumela.gob.mx/modules.php?name=Nukenews&req=print&sid=399> .en línea, hora 16 fecha 07 – 10 – 2013.
- r) E, Molina, **Desarrollo embrionario**, http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/Reproduccion_archivos/Practica%202-eval-ovocitos.pdf .en línea, hora 07 fecha 14 – 10 – 2013.
- s) U, Melli, **Monografías**, <http://www.agro.uba.ar/users/catala/C11%20Biotecnologia%20de%20la%20reproduccion%20animal.pdf> .en línea, hora 10 fecha 22 – 11 – 2013.
- t) E, Minsa, **Monografías de producción in vitro de embriones**, http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2000000100004&script=sci_arttext .en línea, hora 15 fecha 10 – 11 – 2013.
- u) L. Minsa, **cultivo de embriones**, http://bvs.minsa.gob.pe/local%20/Biblio/PLM/src/productos/35563_91.htm .en línea, hora 17, fecha 24 – 11 – 2013.
- v) **Fuente: Baño maria** <http://recordq.com/tienda/baño-maría/> .en línea, hora 11 fecha 16 – 12 – 2013.
- w) **Fuente: Centrifuga** <http://axiom-mms.com/files/plc-05.pdf> .en línea, hora 08 fecha 03 – 12 – 2013.

- x) **Fuente:Estereomicroscopios**,[http://www.nikoninstruments.com/es_AMS/Productos/Sistemas-de Microscopia/Estereomicroscopios/SMZ745-745T](http://www.nikoninstruments.com/es_AMS/Productos/Sistemas-de_Microscopia/Estereomicroscopios/SMZ745-745T) .en línea, hora 16 fecha 04 – 01 – 2014.

- y) **Fuente: Cámara de flujo laminar** <http://recordq.com/tienda/camara-de-flujo-laminar-aura-hz48/> .en línea, hora 20 fecha 13 – 01 – 2014.

- z) **Fuente: Micropipetas**,http://equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=1031 .en línea, hora 12 fecha 16 – 01 – 2014.

GLOSARIO DE TERMINOS

ANDRÓGENO.- hormona sexual masculina que secretan las células de Leydig en los testículos.

CARNERO.- ovino macho adulto

EMBRIÓN.- periodo de crecimiento y diferenciación rápidos durante el cual se establece la mayor parte de tejidos órganos y sistemas.

ESTRO.- periodo durante el cual la hembra animal muestra deseo sexual

HIPÓFISIS.- glándula endocrina que secreta numerosas hormonas, entre ellas la gonadotropina.

IN VITRO.- en vidrio, se refiere a estudios que se realizan en tubos de ensayo o instrumentos de laboratorio, fuera del cuerpo vivo.

TROFOBLASTO.- en las fases iniciales del desarrollo, la capa externa del blastocisto que da lugar a la membrana extraembrionaria.

ESPERMATOZOIDE.- gameto sexual masculino, que está listo para fecundar.

SEMINOGRAMA.- al análisis del eyaculado o semen.

ABREVIATURAS DEL DOCUMENTO

CO₂ =dioxido de carbon

O₂= oxigeno

N₂ = nitrogeno

pH = potencial de hidrogeno

CIV = Cultivo in vitro de embriones

FIV = Fertilización in vitro

MCO = Medio para colección de ovocitos

MIV = Maduración in vitro

MMO = Medio para maduración de ovocitos

FSH = hormona foliculoestimulante

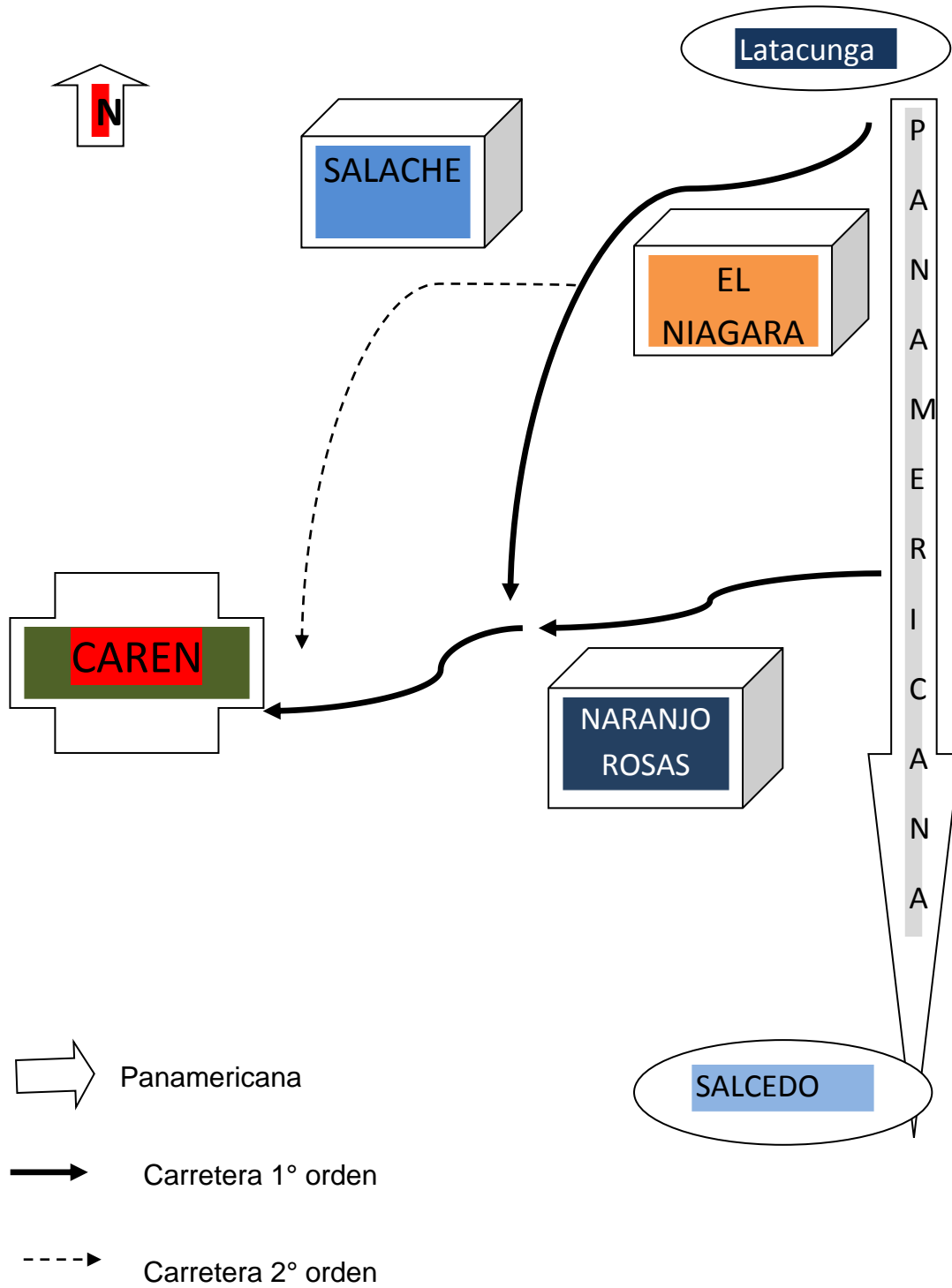
LH = hormona luteinizante

GnRH = hormona liberadora de gonadotropina.

ANEXO

ANEXO N: 1

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL PROYECTO EXPERIMENTAL



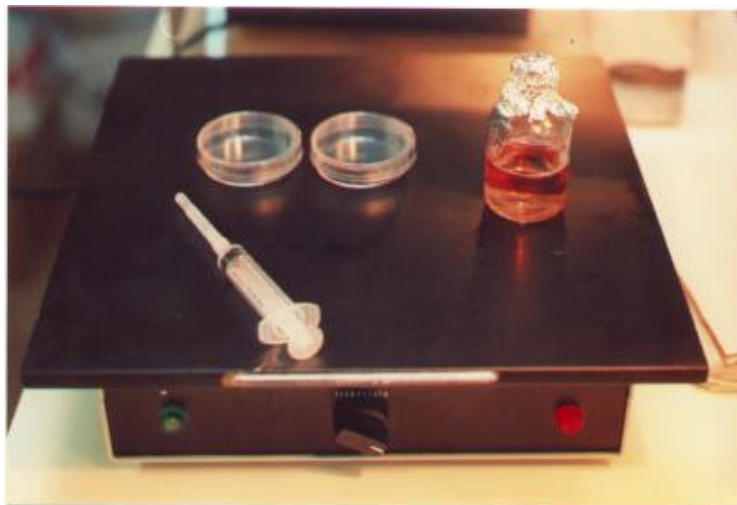
ANEXO N: 2

Ovarios de ovejas en un frasco de boca ancha recolectados del camal de Saquisilí, ubicado en el mismo sector, listos para empezar a obtener ovocitos por medio de la técnica de corte



ANEXO N: 3

Elementos utilizados para la obtención de los ovocitos: platina térmica de mesa, medio de cultivo, jeringa de 5 ml. y aguja 18-g y cápsulas para cultivo desechables.



ANEXO N: 4

Holding plus, sustancia que se utiliza en la caja petri para obtener los ovocitos



ANEXO N: 5

Por medio de la técnica de corte se obtendrá ovocitos, donde se utilizó el bisturí, guantes quirúrgicos y caja Petri con solución holding.



ANEXO N: 6

Punción de folículo ovárico de 3 mm de diámetro.



ANEXO N: 7

Se recolecto folículo por folículo en una caja Petri donde se puso microgotas, esto nos facilitó la extracción de ovocitos



ANEXO N: 8

En el estereomicroscopio se procedió a obtener los ovocitos con dos jeringas de 5 ml. y aguja 18-g cortando folículo por folículo.



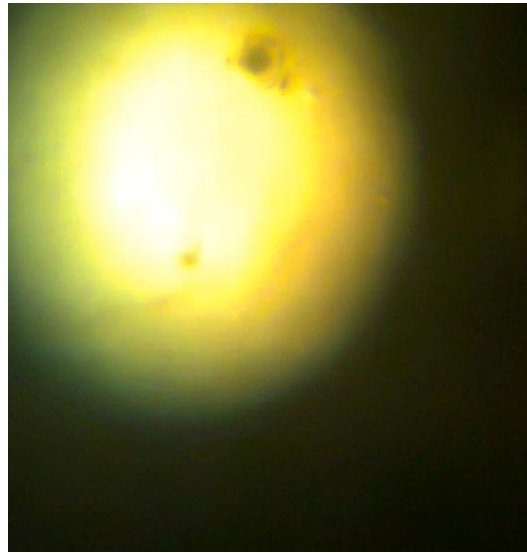
ANEXO N: 9

Ovocito clasificado apto y seleccionado para la maduración in vitro. Se observa ovoplasma homogéneo, completamente rodeado por más de 3 capas de células del cúmulus.



ANEXO N: 10

Ovocitos clasificados no aptos y descartados para la maduración in vitro. ovocito rodeado parcialmente por células del cúmulus y presenta ovoplasma homogéneo.



ANEXO N: 11

Baño maria que utilizamos para madurar e incubar ovocitos



ANEXO N: 12

Tanque de mezcla de gases que se utilizó para la maduración de ovocitos



ANEXO N: 13

Traslado de los ovocitos al baño maría para su respectiva capacitación por medio de la técnica de submarin system.



DESNUDAMIENTO Y FERTILIZACION DE OVOCITOS

ANEXO N: 14

La cámara de flujo laminar listo para desnudar y fertilizar los ovocitos



ANEXO N: 15

Desnudamiento de ovocitos maduros



OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL SEMEN DE CARNERO

ANEXO N: 16

Obtención de espermatozoides de carnero, corte en el epidídimo



ANEXO N: 17

En una caja Petri se recolectó el contenido del epidídimo



ANEXO N: 18

Se procedió a calentar la caja Petri con el contenido del semen del carnero



ANEXO N: 19

Espermatozoides del carnero vista desde el microscopio



ANEXO N: 20

Fertilización de ovocitos



ANEXO N: 21

Ovocitos fértiles y no fértiles luego de la incubación



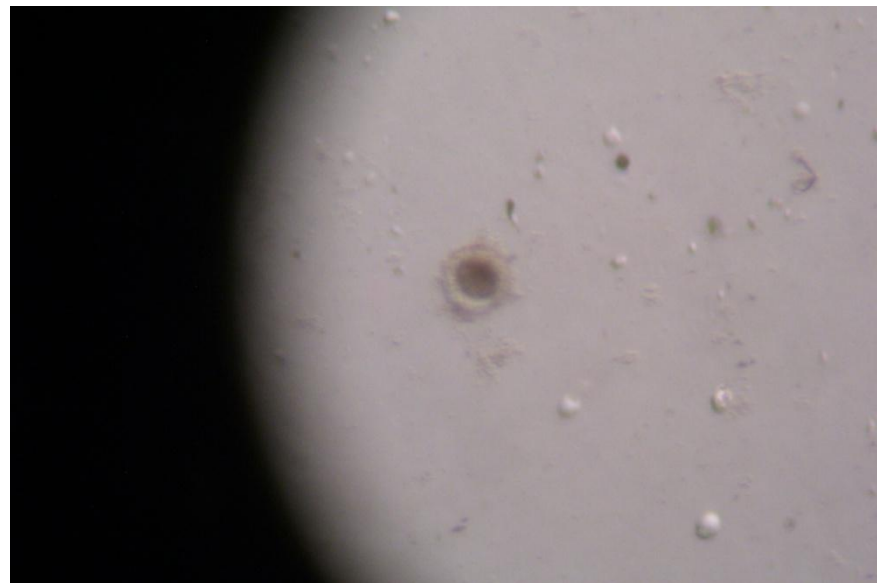
ANEXO N: 22

Embriones de tipo A



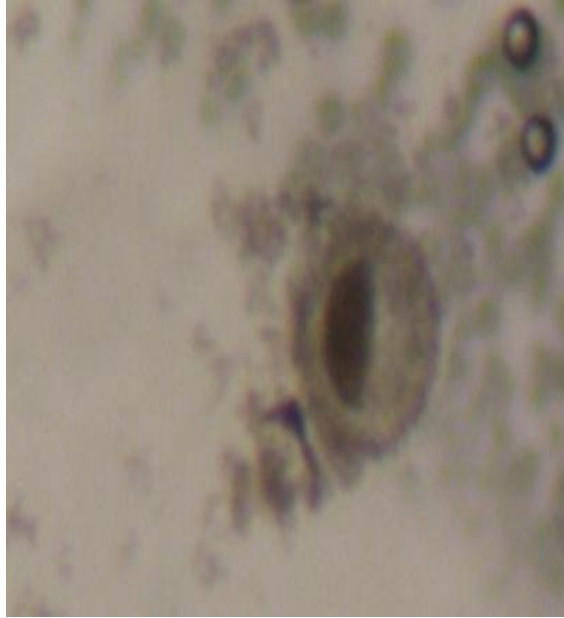
ANEXO N: 23

Embriones de tipo B



ANEXO N: 24

Embriones de tipo C



ANEXO N: 25

Crioconservación de embriones en termo de nitrógeno líquido



