

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



## UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

### CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

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

#### TEMA:

“EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACIÓN DE OVOCITOS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”

#### AUTOR:

**EDMUNDO XAVIER CLAVÓN IZA**

#### DIRECTOR:

Dr. LUIS ALONSO CHICAIZA SANCHEZ

**LATACUNGA – ECUADOR**

JUNIO 2015

## **AUTORÍA**

Quien abajo suscribe:

Edmundo Xavier Clavón Iza portador de la C.I.050316819-7, notifica que los resultados obtenidos en la investigación que presento como Trabajo Práctico, previo a la obtención del Título de Médico Veterinario , son absolutamente originales, auténticos y personales.

En tal virtud declaro 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,

---

Edmundo Xavier Clavón Iza

C.I. 050316819-7

## **AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS**

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

### **“EVALUACION DE LA CRIOCONSERVACION DE OVOCITOS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI”**

Informe de Investigación presentado por Edmundo Xavier Clavón Iza, considero 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 Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi designe para su correspondiente estudio y calificación.

Latacunga, 30 de junio del 2015

---

Dr. Luis Alonso Chicaiza Sanchez  
**La Director**

## **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, el postulante Edmundo Xavier Clavón Iza con el tema de TESIS:

**“EVALUACION DE LA CRIOCONSERVACION DE OVOCITOS DE ALPACAS (Vicugna pacos) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI”**

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

**Atentamente:**

Dr. Edwin Orlando Pino Panchi .....

**PRESIDENTE**

Dra. Blanca Mercedes Toro Molina .....

**OPOSITOR**

Dra. Elsa Janeth Molina Molina .....

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

## 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 MIS PADRES:*

*MARÍA ANTONIA IZA, JOSÉ AMABLE CLAVÓN*

*Por ser mi guía y el pilar fundamental en el transcurso 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*

*TELMO PAUL IZA, EDISON OSWALDO CLAVÓN IZA*

*Por su ayuda y apoyo incondicional que me brindaron en los momentos que más lo necesité, en especial mi hermano TELMO PAUL 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.*

*Edmundo Xavier Clavón Iza*

## 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 mis padres especialmente por darme la vida, enseñarme a dar los primeros pasos 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 director de tesis Dr. Alonso Chicaiza por haber apoyado incondicionalmente en el presente trabajo de investigación. Al Dr. Edwin Pino por la orientación profesional y el tiempo transcurrido del mismo.*

*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.*

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

*Xavier*

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

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

.....  
EDMUNDO XAVIER CLAVÓN IZA

# INDICE GENERAL

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
Portada .....	i
Autoría.....	ii
Aval del director de tesis.....	iii
Aval de los miembros del tribunal.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Declaración expresada.....	vii
Índice general.....	viii
Índice de figuras.....	xi
Índice de cuadros.....	xii
Índice de gráficos.....	xiii
Índice de anexos.....	xiv
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvii
Aval de traducción.....	viii

## CAPÍTULO I

### REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra.....	1
---	---

1.1.1. Vulva.....	2
1.1.2. Los ovarios.....	2
1.1.2.1. Comparación de las anatomías del ovario en diferentes especies.....	2
1.1.3. Los oviductos.....	3
1.1.4. Útero.....	3
1.1.5. Cérvix.....	3
1.1.6. Vagina.....	3
1.2. Ovogénesis.....	4
1.2.1. Crecimiento del folículo y ovocito.....	4
1.2.2. Maduración de los ovocitos.....	7
1.2.3. Maduración nuclear.....	8
1.2.4. Maduración citoplasmática.....	9
1.3. Foliculogénesis.....	10
1.3.1. Folículos primordiales.....	12
1.3.2. Folículos primarios.....	12
1.3.3. Folículos secundarios.....	13
1.3.4. Folículos terciarios.....	13
1.3.5. Folículos de graff.....	13
1.4. Características morfológicas del ovocito.....	14
1.4.1. Corpúsculo polar.....	14
1.4.2. Espacio perivitelino.....	14
1.4.3. Zona pelúcida.....	14
1.4.4. Citoplasma.....	14
1.5. Crioconservación de ovocitos.....	14

1.6. Métodos empleados para la obtención de los ovocitos.....	15
1.6.1. Súper estimulación ovárica.....	15
1.6.1.1. Inhibición de la onda folicular.....	15
1.6.1.2. Hormonas en camélidos para inducir super-estimulación ovárica.....	16
1.6.2. Aspiración folicular mediante laparotomía.....	16
1.7. Clasificación de los ovocitos.....	18
1.7.1. Los ovocitos pueden ser clasificados en cuatro etapas.....	18
1.8. Evaluación de la calidad de los ovocitos.....	18
1.9. Crioprotectores.....	19
1.9.1. Etilenglicol.....	20
1.9.2. Holding.....	20
1.10. Congelación.....	21
1.11. Descongelación.....	21

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Características del lugar.....	23
2.1.1. Situación política.....	23
2.1.2. Situación geográfica.....	23
2.1.3. Datos meteorológicos.....	23
2.2. Recursos materiales.....	24

2.2.1. Materiales de oficina.....	24
2.2.2. Recursos tecnológicos.....	24
2.2.3. Materiales de laboratorio.....	24
2.2.4. Materiales de campo.....	25
2.2.5. Materiales para laparotomía exploración de ovarios.....	25
2.3. Diseño de la investigación.....	26
2.3.1. Tipo de investigación.....	26
2.3.2. Metodología.....	26
2.3.3. Métodos y técnicas.....	26
2.3.4. Análisis estadístico.....	26
2.4. Desarrollo de la investigación.....	26
2.4.1. Protocolo de súper estimulación ovárica.....	27
2.4.2 Ensayo en el laboratorio.....	27
2.4.2.1. Post descongelación.....	28

## **CAPÍTULO III**

### **RESULTADOS Y DISCUSIONES**

3.1. Numero de ovocitos recolectados.....	31
3.2. Estado de madurez de los ovocitos.....	32

3.3. Calidad de ovocitos criopreservados y post descongelados.....	33
CONCLUSIONES.....	35
RECOMENDACIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	36
 ANEXOS	

## INDICE DE CUADOS

Cuadro 1. Comparación de las anatomías del ovario en diferentes especies.....	2
Cuadro 2. Morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de los folículos ováricos...	11
Cuadro 3.- Protocolo de súper estimulación ovárica en alpacas.....	27
Cuadro.4.- Obtención de ovocitos.....	30
Cuadro 5.- Ovocitos recolectados y categorizados en tres tipos.....	31
Cuadro 6. Estados de madurez de los ovocitos.....	32
Cuadro 7. Calidad de ovocitos crioconservados y post descongelados.....	33

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra.....	1
Figura 2. Representación esquemática del crecimiento del ovocito.....	8
Figura 3. Estructuras ováricas.....	13
Figura 4. Clasificación de los ovocitos de acuerdo al tipo (a, b, c, d).....	18
Figura 5. Pasos para la descongelación.....	22

## INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Calidad de ovocitos por categoría.....	31
Gráfico 2. Estado de madurez de los ovocitos .....	32
Gráfico 3. Calidad de ovocitos crioconservados y post descongelado.....	34

## INDICE DE ANEXOS

Foto1 Administración de hormona FSH (foltropion).....	40
Foto 2 Aspiración del líquido folicular.....	40
Foto 3 En el laboratorio con liquido folicular.....	41
Foto 4 Lavado con la solución holding.....	41
Foto 5 Observación de los ovocitos mediante esteriomicroscopio.....	42
Foto 6 Evaluación de los ovocitos.....	42
Foto 7 Visita del tribunal.....	43

## RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi. La crioconservación de ovocitos de alpacas es una biotecnología de la reproducción que en la última década ha sido muy significativa. Esta se presenta como una alternativa de gran trascendencia productiva, con lo cual se puede llegar a producir crías de alto valor genético. El objetivo principal del presente estudio fue determinar el porcentaje de ovocitos obtenidos, determinar la calidad de los ovocitos, estado de madures, crioconservación y post descongelación de los ovocitos recuperados y evaluar la técnica de crio conservación de ovocitos de alpacas desarrollada. El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi, ubicado en el sector de Salache, Cantón Latacunga, utilizado 1 alpaca hembra mayor de 3 años, en la cual se realizó un protocolo de súper estimulación ovárica con FSH (Foltropion) en un periodo de 3 días cada 12 horas aplicando un total de 106mg o 5,30ml vía IM a la misma que posteriormente se le realizó la cirugía de laparotomía exploratoria de ovarios para realizar la colección de ovocitos por aspiración folicular con jeringa de 10 ml y aguja calibre 18, los ovocitos se coloca en un midió holding para su limpieza y posterior evaluación ante un microscopio, para los ovocitos de calidad de tipo A en estadio inmaduro se pasaron a un crioconservante con etilenglicol durante unos 5 a 7 minutos, para proceder al empaclado; para posteriormente realizar la crio conservación de los mismos con una curva lente, la misma que se debe iniciarse en menos -3 grados centígrados, cuando se encuentra la pajilla en menos 10 grados centígrados se realiza el siding, seguido de los - 23 a -34 grados centígrados sacamos la pajilla y la colocamos en el tanque de nitrógeno líquido. Para la evaluación de la pajilla se coloca en agua temperada a 37 grados centígrados se espera unos 2 minutos; con la ayuda de una micro pipeta universal se extrajo el contenido y se colocó en una caja Petri para ser llevado al estereoscopio donde se observa cada una de las estructuras de los ovocitos para determinar su calidad y vialidad. El análisis estadístico de esta investigación está basado en porcentajes (100%) y se obtuvo los siguientes resultados de 2 ovarios se obtuvo 9 ovocitos los mismos que están categorizados en: Tipo A con un 75%, Tipo B con un 25 % y Tipo C con 0 % y de acuerdo al estado de madurez se determina que el 75% corresponden a inmaduros y el 25 % corresponden a maduros, mientras que los ovocitos crio conservados representa un 75% y post descongelados representan un 25 % concluyendo que si provoco cambios irreversibles al efecto toxico de etilenglicol después de la descongelación.

## ABSTRACT

This research was conducted in the laboratory of Reproductive Biotechnology in the School of Veterinary Medicine at the Technical University of Cotopaxi. Alpacas Oocyte cryopreservation is a reproduction biotechnology in the last decade has been significant. This is presented as an alternative of big productive transcendence, which can eventually produce offspring of high genetic value. The main objective of this study was to determine the percentage of oocytes obtained, the oocyte quality, state of maturity, cryopreservation and after thawing of oocytes retrieved and technique evaluate of the alpacas developed oocytes cryopreservation. The study was conducted in the Laboratory of Reproductive Biotechnology at the Technical University of Cotopaxi, located in the Salache area, Latacunga Canton, used one female alpaca over 3 years, in which a super ovarian stimulation protocol was carried out FSH (Foltropion) in a 3 day period every 12 hours using a total of 106mg intramuscularly or 5,30ml IM path subsequently conducted exploratory laparotomy surgery for ovarian oocytes collection by follicular aspiration syringe 10 ml and needle gauge 18, the eggs are placed in a holding measured for cleaning and further evaluation before a microscope to oocyte quality type A in immature stage they were transferred to a cry protectant with ethylene glycol for about 5 to 7 minutes to proceed to the packaging; later to make cry conservation there of with a curved lens, the same to be initiated in less of 3 degrees centigrade, when the straw is at least 10 degrees centigrade Celsius siding is performed, followed by - 23 to -34 Celsius we took the straw and place it in the tank of liquid nitrogen. For the evaluation of the straw placed in water heated to 37 degrees Celsius it is expected about 2 minutes; with the aid of a micro pipette universal content he is removed and placed in a Petri dish to be taken to observe stereoscopic where each oocyte structures to determine their quality and viability. Statistical analysis of this research is based on percentages (100%) and the following results 2 ovaries had 9 oocytes are obtained the same as those categorized as: Type A with 75%, Type B with 25% and Type C to 0% depending on the state of maturity is determined that 75% are immature and 25% are mature, while the cry oocytes preserved represents 75% and post thawed represent 25% concluding that if I cause irreversible changes the toxic effect of ethylene after thawing.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**

**CENTRO CULTURAL DE IDIOMAS**

**AVAL DE TRADUCCIÓN**

En calidad de Docente del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi, yo Lic. Mgs. Martha Cecilia Cueva, con cédula de ciudadanía N° 17502244-8 CERTIFICO que he realizado la respectiva revisión de la traducción del abstract con el tema: “EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACIÓN DE OVOCITOS EN ALPACAS (*Vicugna pacos*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI” cuyo autor es: Edmundo Xavier Clavon Iza y director de tesis Dr. Alonso Chicaiza.

Latacunga, 9 de junio 2015

Docente:

.....  
Lic. Mgs. Martha Cecilia Cueva

C.I. 17502244-8

## INTRODUCCION

La crioconservación de ovocitos es una tecnología de la reproducción que ha experimentado un gran adelanto en las últimas décadas y ha dotado a la ciencia de nuevas herramientas capaces de manipular y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados: los mamíferos.

Es importante señalar que la crioconservación de ovocitos de alpacas, ha presentado una serie de dificultades principalmente la obtención de ovarios de alpacas de camales sabiendo que en nuestro país no existe un número excesivo para la faena de esta especie y se realizó en una alpaca viva para poder realizar la investigación y obtener los ovocitos mediante la realización de una laparotomía y con esto no se faena al animal y continua con su vida reproductiva.

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

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

La crianza de alpacas es una buena alternativa de producción agropecuaria debido a la suma de cualidades que tiene la especie dentro de estas son principalmente la conservación de los recursos naturales y paramos de nuestro país.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Determinar la crioconservación de ovocitos en Alpacas (*Vicugna pacos*) en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

## **Objetivos específicos**

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

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis alternativa (H1):**

- Se crioconservará ovocitos de alpacas

### **Hipótesis nula (H0):**

- No se crioconservará ovocitos de alpacas

# CAPÍTULO I

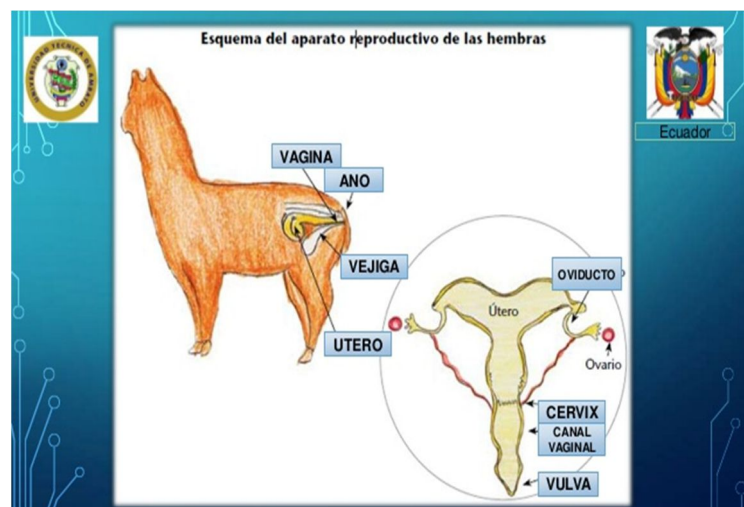
## 1.- REVISIÓN DE LITERATURA

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

### 1.1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA

Los órganos de este sistema casi todos se encuentran alojados en el abdomen, producen los óvulos y ayudan a que estos puedan ser fertilizados, se desarrollen durante la gestación o involucionen para dar pasó a otro ciclo sexual de la hembra. Los órganos del aparato reproductor de la hembra incluyen ovarios, oviductos, útero, cuello uterino, vagina y vulva. (GARCIA, 2009)

**FIGURA 6. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA**



Fuente:(FERNY, 2014)

### 1.1.1. Vulva

Externamente, el órgano femenino visible es la vulva. Es una apertura orientada verticalmente, de 2,5 a 3.0 cm de longitud. Tiene labios externos bien definidos, que en la parte inferior termina con una protuberancia. No se observan cambios marcados en el aspecto de la vulva en relación a los ciclos foliculares. Se le puede notar tumefacta y algo hinchada en hembras muy próximas al parto (REV, 2012)

### 1.1.2. Los ovarios

Son órganos pares localizados en la cavidad abdominal. Están fijados al mesovario y envueltos y por la bolsa ovárica. En la alpaca, el ovario mide en promedio 15mm de largo, 12mm de ancho y 09mm de espesor el ovario izquierdo pesa 2,4 – 1,3g y el derecho 1,9- 1.0g. Con la presencia del cuerpo lúteo el peso ovárico se incrementa ya que esta glándula pesa 1,2 a 1,7g lo que representa la mayor proporción del peso total del ovario. (VILCA, 2008)

#### 1.1.2.1. COMPARACIÓN DE LAS ANATOMÍAS DEL OVARIO EN DIFERENTES ESPECIES

**CUADRO 4. COMPARACIÓN DE LAS ANATOMÍAS DEL OVARIO EN DIFERENTES ESPECIES**

	VACA	OVEJA	CERDA	YEGUA	CONEJA	ALPACA
NÚMERO	2	2	2	2	2	2
FORMA	Almendra	Almendra	Racimo de uvas	Arriñonada	Ovoide	Racimo de uvas
TAMAÑO	3.5-4 largo 2.5 ancho	1.5x1x1	5 largo y ancho.	7- 8 largo 3-4ancho	1.5cm	5 y 12 mm

**Fuente:**(HAFEZ, 2002)

### **1.1.3. Los oviductos**

Los dos oviductos (o trompas de Falopio) son tubos delgados de unos 20 cm de longitud. Por ellos desciende el ovulo para encontrarse con el espermatozoide y permite la fecundación. Son conductos sinuosos que llevan el ovocito del ovario respectivo al cuerno del útero, a la vez que sirven como lugar natural donde dicho óvulo puede ser fecundado por el espermatozoide. La porción del oviducto adyacente al ovario se despliega en forma de embudo (infundíbulo). El borde del infundíbulo, en forma de fleco, se llama fimbria. La luz del órgano presenta una mucosa con muchos pliegues, revestido por un epitelio cilíndrico ciliado simple. El resto de la pared comprende una submucosa de tejido conectivo, una capa de músculo liso circular, y superficialmente, otra capa conectiva cubierta de peritoneo. (LOPES, 2010)

### **1.1.4. Útero**

Será el órgano que aloja al feto durante 11 meses de gestación. Tiene forma de Y en alpacas y está constituido por dos oviductos, cuerpo del útero y cérvix. En hembras no preñadas el cuerpo del útero es de aproximadamente 2 a 4 cm de largo, mientras que los cuernos son de unos 8 a 15cm, el cuerpo izquierdo (donde se desarrolla la casi totalidad de la preñeces) de mayor tamaño que el derecho. Durante la copula el macho deposita el semen en el útero y los espermatozoides migran de allí hasta el lugar de fertilización. (MACHACA, 2013)

### **1.1.5. Cérvix**

Es una estructura con forma de espiral apretada (con dos o tres vueltas) de tejido muscular. El canal cervical (que conecta la vagina con el útero) es sinuoso y de unos 2 a 4 cm de longitud. En hembras no preñadas y receptivas al macho, el

cérvix se presenta penetrable, permitiendo así la intromisión del pene para la deposición de semen en el útero. En contraste, el cérvix se cierra una vez que ocurre la concepción, y permanece cerrado durante toda la preñez (CHRIS, 2015)

### **1.1.6. Vagina**

Normalmente la vagina de las alpacas es de 12 a 18 cm de largo y 2 a 4 cm de diámetro. Esta se dilata para permitir la salida de la cría, pero los partos difíciles a menudo provocan lesiones en la vagina. (WILBER, 2009)

## **1.2. OVOGÉNESIS**

Durante el desarrollo fetal, las células germinales primordiales del ovario van a sufrir un proceso de diferenciación. Primero se transforman en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a los ovocitos primarios al iniciarse la primera división meiótica. La meiosis es un tipo de división celular exclusiva de las células germinales (ovogonias y espermatogonias) y su objetivo es doble: la reducción a un número haploide de cromosomas y la recombinación de la información genética, antes de sufrir la meiosis, las células germinales replican su ADN y contienen en ese momento 4 copias de ADN y un número  $2n$  de cromosomas, como cualquier célula diploide; mientras que entre las dos divisiones meióticas la replicación de ADN queda suprimida, lo que asegura que los gametos resultantes sean haploides. (HAFEZ, 2002)

La meiosis consiste en dos divisiones: en la primera, las dos células hijas pasan a tener  $1n$  cromosomas y 2 copias de ADN; y en la segunda, las 2 células resultantes contienen  $1n$  cromosomas y 1 copia de ADN. Así, con la meiosis se obtienen 4 células hijas haploides y genéticamente diferentes, en el caso del macho; mientras que en la hembra sólo da lugar a una célula, pues las dos

divisiones meióticas son asimétricas, y en cada una se forman una célula grande y otra pequeña abortiva (corpúsculo polar). De este modo, se minimiza la pérdida de productos almacenados en el ovocito, necesarios para el posterior desarrollo embrionario temprano. (PALMA, 2011)

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

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

El folículo primordial se transforma en folículo primario, donde el ovocito está rodeado por una capa unilaminar de células granulosas cuboides, derivadas de las pregranulosas, en el folículo primario se produce un aumento del volumen del ovocito, sin división celular del mismo, y una hiperplasia e hipertrofia de las células de la granulosa, dando lugar al folículo secundario (un folículo preantral multilaminar). (HERMANDEZ, 2006)

El crecimiento folicular va acompañado de la formación de una capa de células de la teca vascularizada alrededor de la membrana basal, al alcanzar las células de la granulosa un número elevado, y en respuesta a la FSH, se forma la cavidad antral repleta de fluido folicular, tras la formación del antro, las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones: las células de la granulosa que revisten la pared del folículo y forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal; y las células del cumulus ophorus que forman varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito. Cuando el folículo ha formado la cavidad antral, pasa a llamarse folículo terciario, antral o de Graff. (HAFEZ, 2002)

En esta etapa de crecimiento se van a establecer unas comunicaciones entre el ovocito y las células del cúmulus, mediante unos procesos citoplasmáticos de las

células de la corona radiata que cruzan la ZP y conectan con el olema, estas uniones intercelulares posibilita el intercambio de moléculas entre el ovocito, las células de la granulosa y la circulación sanguínea, con una finalidad nutritiva y reguladora, constituyendo el proceso de “cooperación metabólica”. Las células somáticas proporcionan nucleótidos, aminoácidos y fosfolípidos, además de mantener un balance iónico y una estabilidad en el ARNm en los ovocitos. (REV, 2010)

Los folículos dominantes serán seleccionados de entre los folículos antrales para continuar su crecimiento y mediante la selección de los folículos que producirán ovocitos maduros listos para ovular en cada ciclo estrale está determinada por la expresión de receptores para la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) en sus células de la granulosa.(17). Por ejemplo, en los folículos antrales pequeños, cuyas células de la granulosa no poseen receptores para la LH, la reanudación de la meiosis inducida por esta gonadotropina no se podrá producir; por lo tanto, los folículos seleccionados deberán disponer de estos receptores. Los receptores para la FSH, presentes en la hembra en las células de la granulosa, aumentan de número en la fase de crecimiento, la misma que va actuar sobre las células de la granulosa, desencadenando la expresión de una batería de genes que codifican factores de crecimiento, enzimas y proteínas involucradas en la esteroidogénesis y péptidos que regulan la liberación de gonadotropinas; los cuales se van a sintetizar y acumular en el fluido folicular, además las células de la teca, estimuladas por la LH, van a sintetizar andrógenos que, posteriormente serán transformados en estradiol por las células de la granulosa.(GOMEZ, 2003)

Los folículos dominantes tienen un mayor número de receptores para la FSH y son más sensibles a ella que el resto de folículos astrales, por lo que van producir grandes cantidades de estradiol e inhibina. El estradiol y la inhibina van a regular negativamente la secreción de FSH y, al disminuir su concentración, los folículos

menos sensibles a la FSH degeneran, sufriendo el proceso de atresia.(HORVATH, 2008)

Justo después del pico preovulatorio de LH, los folículos seleccionados comienzan una rápida expansión como resultado de la acumulación de fluido folicular en el antro. Las altas concentraciones de gonadotropinas en el fluido folicular cambian el patrón de síntesis de esteroides de las células de la granulosa y la teca y preparan al ovocito para la reanudación de la meiosis y la maduración.(RIVERA, 2004)

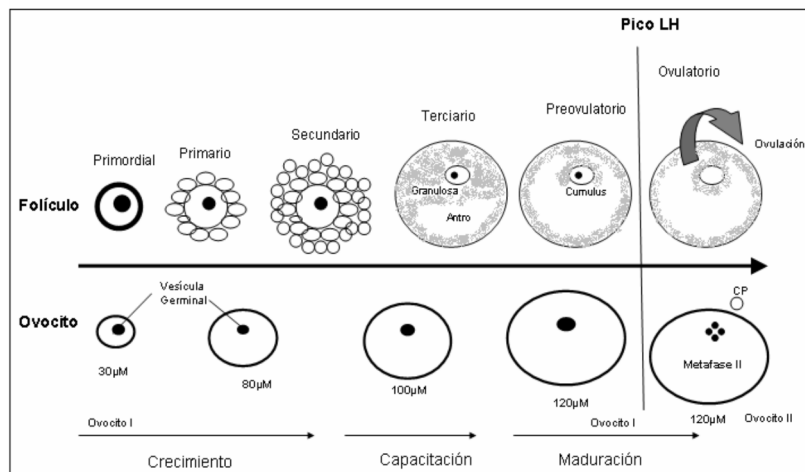
### **1.2.2. Maduración de los ovocitos**

La maduración del ovocito está dividida en maduración nuclear y maduración citoplasmática, hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membranas que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente.El estímulo que desencadena el inicio de la maduración del ovocito es el aumento preovulatorio de los niveles de gonadotropinas, en especial LH además de la reanudación de la meiosis, el pico de LH desencadena otras transformaciones dentro del folículo como alteraciones en la esteroidogénesis folicular y cambios en el complejo cúmulo-ovocito (COCs), la respuesta inmediata de las células de la granulosa a la interacción con la LH es la activación de la adenilatociclasa y la generación de AMPc. Por tanto, la reanudación de la meiosis viene precedida por un aumento en el AMPc; mismo que desempeña un papel doble en la regulación de la meiosis, por ende los niveles basales de AMPc producidos por las células somáticas en los folículos antrales pequeños son transferidos de manera continua al ovocito, a través de las uniones tipo gap, sin embargo, a partir de la formación de receptores para la LH en las células del cúmulo y granulosa del grupo de folículos dominantes, éstos pueden

responder al pico preovulatorio de la LH produciendo grandes cantidades de AMPc.(LARS, 2005)

Las elevadas concentraciones de AMPc en los folículos dominantes intervienen en la acción de la LH sobre la conexina 43, una proteína que forma parte de las uniones tipo gap ováricas. Mediante reacciones de fosforilación/defosforilación, se producen cambios en la conformación de la conexina 43 que inducen una inmediata reducción de las comunicaciones intercelulares en dichos folículos y, por tanto, en la cooperación metabólica entre sus células. Este fenómeno, conocido como expansión o mucificación del cúmulus se produce 16 horas después del pico de gonadotropinas; bajo esas condiciones, el flujo de AMPc desde las células del cúmulus hacia el ovocito desciende por debajo del umbral requerido para inhibir la activación del factor promotor de la maduración o de la metafase (MPF) y el ovocito reanuda la meiosis.(RIVERA, 2004)

**FIGURA 7. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL CRECIMIENTO DEL OVOCITO, CAPACITACIÓN Y MADURACIÓN DURANTE LA FOLICULOGÉNESIS**



**Fuente:** (MEEMILLOD, 2008)

### **1.2.3. Maduración Nuclear**

Comienza tras la reanudación de la meiosis es decir el paso de vesícula germinal a metafase II (MII) con lleva la disolución de la membrana nuclear como “rotura de la vesícula germinal”, la formación del huso meiótico y la condensación de cromatina en cromosomas homólogos que se alinean en el huso, alcanzan el estadio de metafase I, para continuar con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos dando lugar a la extracción del primer corpúsculo polar (CP) y al paso del ovocito al estadio de MII. La maduración nuclear finaliza cuando el ovocito completa la primera división meiótica con la formación del primer corpúsculo polar alcanzando el estadio de MII, después del pico de LH, tras lo cual se produce la segunda detención de la meiosis. (REYES, 2007)

El MPF en forma activa es necesario para la rotura de la VG , la condensación de la cromatina y su actividad alcanza un pico en Metafase I y II, para de crecer en anafase I y II lo que indica que su inactividad también es necesaria para esta progresión , por otra parte la reorganización de los microtúbulos y la apropiada orientación del huso durante la MII parece estar mediada por las MAP kinasas (MAPK), cuya actividad también esta inhibida de algún modo por el AMPc y aumenta con la reanudación de la meiosis. A diferencia del MPF, la actividad del MAPK permanece elevada en los estadios de anafase. (UNESUR, 2013)

### **1.2.4. Maduración Citoplasmática**

En el citoplasma del ovocito se produce una redistribución de las mitocondrias y de los gránulos corticales (GC). Tras la rotura de la VG, las mitocondrias migran para situarse en una posición perinuclear durante la maduración siendo este movimiento mitocondrial necesario para la progresión de la maduración. Los GC son un tipo especial de lisosomas primarios, formados a partir del complejo de

Golgi y del retículo endoplásmico, compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas. Los GC migran hacia la periferia del ovocito, aumentan de número al final del periodo de maduración y se sitúan debajo de la membrana plasmática formando una monocapa. Además, la maduración citoplasmática implica una reprogramación de la síntesis proteica, parte del ARNm que había sido almacenado durante la fase de crecimiento comienza a transcribirse, sintetizándose nuevas proteínas que serán esenciales en la progresión de la meiosis, la regulación de la penetración espermática y la descondensación de la cabeza del espermatozoide. (RAHMAN, 2008)

### **1.3. FOLICULOGÉNESIS**

Es el proceso de crecimiento que experimenta el folículo desde el momento que deja la población de reserva constituida por folículos primordiales, hasta su ovulación o atresia. El folículo ovárico es una unidad altamente compleja y consiste de distintos tipos de células somáticas este folículo provee un microambiente para el crecimiento del ovocito y es el responsable para la producción de Hormonas. (RODRIGUEZ, 2003)

Los ovocitos rodeados por las células de la granulosa y su membrana basal y, posteriormente por células intersticiales para formar la teca mismos que comparten un sistema de comunicación muy eficiente. Así mismo, el ovocito tiene un papel activo en la promoción del desarrollo folicular y en la diferenciación de las células de la granulosa a través de la secreción de factores de crecimiento por otra parte, las células de la granulosa regulan el crecimiento del ovocito. El ovocito interactúa con las células de la granulosa que lo rodean, lo que evita la luteinización precoz del cumulus ooforus por inhibición del receptor de LH, y regula también la esteroidogénesis y la secreción de inhibina (CASTAÑEDA, 2011)

**CUADRO 5. ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LOS FOLÍCULOS OVÁRICOS**

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

**Fuente:**(HAFEZ, 2002)

### **1.3.1.Folículos primordiales**

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

- 1.- Un incremento en el tamaño del ovocito
- 2.- Un cambio en la forma de las células granulosas, pasan de planas a cúbicas
- 3.- Comienza a formar la zona pelúcida. (HORVATH, 2008)

### **1.3.2.Folículos primarios**

Posteriormente las células cúbicas se multiplican y aparecen 2 o más capas de las mismas.- En este momento una red de capilares invade la trama fibrosa ubicando entre las células que rodean al folículo y constituyen la capa vascular teca interna, la cual aporta los nutrientes a la membrana granulosa y al ovocito, por fuera de esta capa se encuentra la teca externa rica en tejido conectivo y fibroblastos. (VANTMAN, 2010)

### **1.3.3. Folículos secundarios**

Comienza aparecer espacios entre las células granulosas, consecuencia de la secreción de un material de consistencia líquida por parte de dichas células estos espacios posteriormente confluyen en una cavidad denominada antro folicular, el cual irá aumentando en tamaño hasta adquirir características de aquel presente en el folículo preovulatorio o de Graff. (URBINA, 2009)

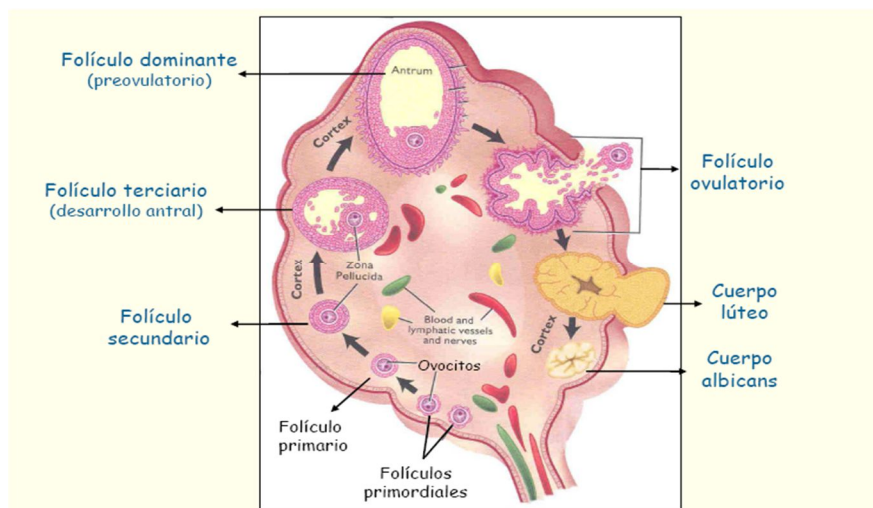
### 1.3.4. Folículos terciarios

El líquido presente en esta cavidad se le denomina licor folicular, a partir de la aparición de la cavidad folicular, los folículos reciben el nombre de folículos terciarios. (VANTMAN, 2010)

### 1.3.5. Folículos de Graff

Son folículos terciarios ya madurados que resaltan sobre la superficie ovárica como una pequeña vesícula llena de líquido folicular están formados por dos capas de células foliculares o tecas (interna y externa) separadas por una membrana basal de la cubierta celular interior de granulosa que rodea el antro folicular y el ovocito. (ARIAS, 2007)

**FIGURA 8. ESTRUCTURAS OVÁRICAS**



**Fuente:**(SENGER, 2004)

## **1.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL OVOCITO**

### **1.4.1. Corpúsculo polar**

La presencia de un corpúsculo polar biomorfo, aunque no afecte a la tasa de fecundación, si afecta al posterior desarrollo del embrión, así como a la tasa de preñez.(PRODUCCION, 2010)

### **1.4.2. Espacio peri vitelina**

Un espacio peri vitelino agrandado, irregular, con contenido en su interior, disminuye la tasa de embarazo, aunque no afecte a la tasa de fecundación.(JARAMILLO, 2009)

### **1.4.3. Zona pelúcida**

La existencia de una zona pelúcida engrosada, adelgazada, irregular o tabicada o con diferente densidad, afecta a la tasa de ovocitos que no continúan su desarrollo tras la ICSI (Inyección intracitoplasmática del espermatozoide)(PRODUCCION, 2010)

### **1.4.4. Citoplasma**

La presencia de anomalías del citoplasma como granulaciones, inclusiones, cuerpos refráctales, vacuolas, etc., se ha demostrado que disminuye la tasa de embarazo). Otros autores consideran que las anomalías en el citoplasma son un factor pronostico pobre, aunque si un signo de inmadurez citoplasmática también se ha demostrado una relación directa entre las anomalías citoplasmáticas y el número de anaploidias. (RUIZ, 2008)

## **1.5. CRIOCONSERVACIÓN DE OVOCITOS**

La crioconservación de ovocitos es un proceso fisicoquímico complejo de transporte de agua y calor entre la célula y el medio que lo rodea, la crioconservación se lleva a cabo mediante las exposiciones de ambos a temperaturas bajas. Si sobrepasa de la temperatura se producirá la formación de los cristales de hielo lo que provocara alteraciones en la membrana, cuando la suspensión celular es enfriada y alcanza a temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo distribuidos aleatoriamente en el medio extracelular que dan lugar a una fase cristalina. (LOROCCA, 2002)

## **1.6. MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS OVOCITOS**

Los ovocitos son recuperados a partir de los ovarios de las hembras destinadas a tal fin de diferentes maneras:

- A partir de ovarios de mataderos
- A partir de alpacas vivas.

En la investigación que se realizara será en una alpaca viva porque en nuestro país y no existe un número excesivo de animales que faenen en los diferentes camales de nuestra provincia y país para obtener ovarios de mataderos. (LEAL, 2010)

### **1.6.1. Súper estimulación ovárica en alpacas**

#### **1.6.1.1. Inhibición de la onda folicular**

Según Bourk en 1995 al implantar súper estimulación ovárica es necesario comenzar el tratamiento hormonal en ausencia de folículos dominantes. Miragaya

en el 2006 observaron que iniciar el tratamiento en presencia de un folículo mayor a 5 mm induce el crecimiento de ese único folículo. Para lograr inhibir la dinámica ovárica, se han desarrollado varios protocolos basados en el efecto negativo de la progesterona sobre la actividad folicular. Aba en 1995. Se puede utilizar una fase luteal natural (induciendo la ovulación) o reproducción la fase luteal artificialmente utilizando progesterona o progestágeno exógeno. (SORIA, 2013)

#### **1.6.1.2. Hormonas utilizadas en camélidos para inducir super-estimulación ovárica**

Los tratamientos con 1000 y 1500 UI de hormona gonadotrofina corionica equina son efectivos en inducir crecimiento folicular múltiple, pero con la aplicación de 1500UI es mayor la producción de folículos. Además, la super-estimulación con hormona gonadotrofina corionica equina está asociada a una mayor proporción de complejos ovocitos cúmulos expandidos y COC,s en MII, comparados con el tratamiento con FSH. Los camélidos son ovuladores inducidos, por lo tanto, la maduración en vivo de ovocitos dentro del folículo puede producirse mediante la inducción de la liberación de LH administrando análogos de GnRH, como la buserelina o hCG. La administración de buserelina es beneficiosa para la recuperación de una gran cantidad de complejos ovocitocúmulo expandidos, los cuales pueden ser utilizados directamente en técnicas de reproducción asistida sin necesidad de la previa maduración in vitro. (GARCIA, 2005)

Tal como en otra especie, en alpacas se han estudiado diversos protocolos para inducir el desarrollo folicular mediante el uso de FSH y PMSG. Ratto et. (1997) reporta una respuesta similar en el número de folículos  $\geq 6$  mm entre alpacas tratadas con FSH y eCG. En lo que se respecta a FSH, se ha reportado el uso de múltiples dosis (6 a 10) cada 12 horas (en 3 a 5 días de tratamiento) con una dosis total de 50 a 200mg, pero sin resultados promisorios (GAMARRA, 2007)

## **1.6.2. Aspiración folicular mediante laparotomía**

Conjunto de maniobras quirúrgicas que se realizan a los efectos de crear una vía de acceso a los órganos contenidos en la cavidad abdominal.

A continuación se detallan las maniobras quirúrgicas necesarias para la realización de una laparotomía:

- a) Incisión de la piel con bisturí sobre la línea sagital
- b) Divulsión del tejido subcutáneo
- c) Incisión de línea alba y peritoneo.(SAPPIA, 2012)

Una vez localizado los ovarios se punzan los folículos maduros que contienen las gametas femeninas (ovocitos)

El líquido aspirado se vierte en una placa de Petri, de inmediato se procede a su identificación y valoración en el laboratorio de FIV.

Es indispensable una revisión pre anestésico completa en la que, según cada caso, se decidiera el tipo anestésico más adecuado (generalmente una sedación)

Se observa y valora cada uno de los ovocitos y las células foliculares que lo rodean.

La técnica con mayor porcentaje de recuperación de ovocitos es la aspiración de folículos vía laparotomía.(SAPPIA, 2012)

## **1.7. CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS**

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

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

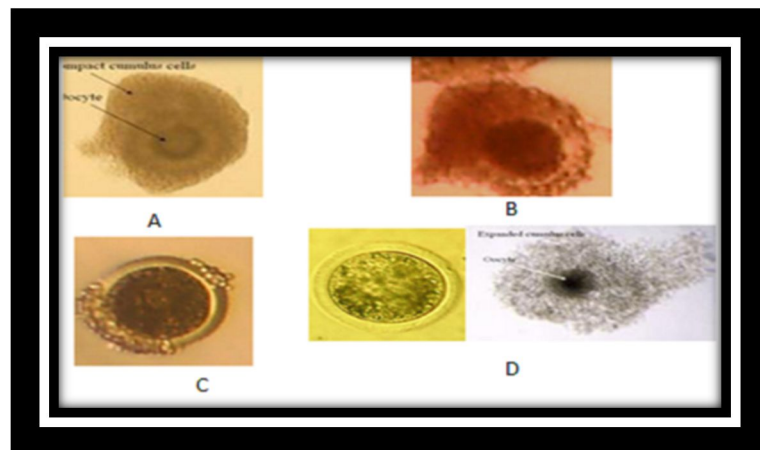
**Tipo A:** Corresponde a un ovocito con células de cumulus con capas múltiples mayor a 4, son compactas y el citoplasma es homogéneo y transparente.

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

**Tipo C:** Cumulus desnudo y con citoplasma irregular con zonas oscuras.

**Tipo D:** Tiene un cumulus con células expandidas y un citoplasma irregular con zonas oscuras. (INTA, 2010)

**FIGURA 9. CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS DE ACUERDO AL TIPO (A, B, C, D)**



**Fuente:**(HERMANDEZ, 2006)

## 1.8. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS

Se debe tomar en cuenta los siguientes parámetros:

### 1. *Inmaduro*

- Pequeño, compacto, gris, cumulus no expandido
- Células de corona formando un anillo oscuro alrededor de la zona pelúcida, ovocito apenas visible.(HICAPIE, 2010)

## **2. *Maduro***

- Cumulus expandido, pequeño.
- Corona no irradiada completamente.
- Ovocito parcialmente visible.(MUCCIN, 2010)

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

- Cumulus grande y expandido
- Corona irradiada
- Ovocito claro y visible.(GARDE, 2011)

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

- Cumulus pequeño y fino con pequeños parches de células oscuras.
- Se podrá observar un ovocito visible usualmente oscuro.(FELMERR, 2009)

## **5. *Post maduro y atrésico***

- Pequeños cumulus o totalmente
- Ovocito oscuro .(HAFEZ, 2002)

## **1.9. CRIOPROTECTORES**

Son sustancias que protegen a las células durante la crioconservación con la finalidad de evitar el daño que puede causar el agua intracelular al formar cristales de hielo durante la congelación, reducen el hielo y reemplazan las moléculas de agua removidas durante la congelación, inhiben la actividad de muchas enzimas disminuyendo la lisis celular antes, durante y después de la congelación. (LIM, 2007)

### **1.9.1. Etilenglicol**

El etilenglicol es un compuesto químico que pertenece al grupo de los dioles, es un líquido transparente, incoloro, ligeramente espeso como el almíbar y leve sabor dulce por estas características organolépticas se suele utilizar distintos colorantes para reconocerlo y así disminuir las intoxicaciones por accidente, a temperatura ambiente es poco volátil, pero puede existir en el aire en forma de vapor. Se utiliza como anticongelante en los circuitos de refrigeración de motores de combustión interna, como difusor del calor, para fabricar compuestos de poliéster, y como disolvente en la industria de la pintura y el plástico. El etilenglicol es también un ingrediente en líquidos para revelar fotografías, fluidos para frenos hidráulicos y en tinturas usadas en almohadillas para estampar, bolígrafos, y talleres de imprenta. (EMAIL, 2013)

### **1.9.2. Holding**

Holding Plus es el primer medio de mantenimiento de transferencia de embriones bovinos basado en una fórmula adaptada de un medio de cultivo de embriones probado. Está diseñado para apoyar la supervivencia óptima de embriones en aire a temperatura ambiente y proporciona los aminoácidos, factores de crecimiento, enzimas, sustratos de energía y antibióticos esenciales. No es un medio apropiado para el cultivo a largo plazo de embriones bovinos en una incubadora de CO<sub>2</sub>. - Envasado en sobres de EVA con un puerto con septo para aguja y en tubos desechables de 8 ml. Su vida útil es de 18 meses desde la fecha de fabricación, siempre que se utilice una técnica estéril y el almacenamiento recomendado es de 2 a 8 °C. (PEREZ, 2011)

### **1.10. CONGELACIÓN**

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

la célula, por lo tanto la célula se deshidrata. El tiempo en el que se expone el ovocito al crioprotector es de 10 a 30 minutos lo cual permitirá una deshidratación adecuada la misma que reduce el riesgo de formación de cristales de hielo intracelulares que son nocivos para las células. Los rangos de congelación consisten en un descenso de temperatura a un ritmo de 0.3- 0.5 °C / min desde el momento en que comienza la formación de hielo que suele ser entre -5 y -9 °C hasta llegar a temperaturas de -33 y -40 °C y posteriormente pasar a nitrógeno líquido para evitar la formación intracelular de cristales de hielo se realiza el seeding, el cual consiste en que una vez estabilizada la pajilla a una temperatura de -5 y -9 °C se toca su pared con un objeto enfriado a -196°C y de este modo se cristaliza el líquido extracelular de manera controlada. (LM, 2006)

### **1.11. DESCONGELACIÓN**

Para la descongelación del material genético (ovocitos) se debe tomar en cuenta las siguientes indicaciones: Luego de retirar la pajuela de la conservadora de nitrógeno líquido y antes de colocarla en el termo de boca ancha para su descongelación es conveniente sacudirla enérgicamente en un solo movimiento como quien desciende la temperatura de un termómetro clínico. Este movimiento ayuda a que se desprenda de la misma una gota de nitrógeno líquido que puede haber quedado en la parte posterior del tapón de algodón. Eliminar el nitrógeno reduce las posibilidades de "estallido" de la pajuela al ser colocada a baño maría para su descongelamiento. Una vez que la pajuela ha sido descongelada, secada y antes de cortarla es conveniente nuevamente sacudirla con un movimiento seco tomándola desde el extremo a cortar, con la finalidad de que la burbuja de aire se desplace bien hacia dicho extremo. (RAY, 2010)

## **CAPÍTULO II**

### **2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

En este capítulo se detalla la metodología que se utilizó para realizar la presente investigación, también se describe las características, ubicación y el desarrollo de la investigación.

#### **2.1. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR**

##### **2.1.1. Situación política**

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

##### **2.1.2. Situación geográfica**

- ❖ Latitud: 00° 59'47.68"S
- ❖ Longitud: 78° 37'19.16" E.
- ❖ Altitud: 2757.591 m.s.n.m.

##### **2.1.3. Datos meteorológicos**

- ❖ Temperatura promedio: 10.7°C
- ❖ Pluviosidad: 175 mm(anuales)
- ❖ Horas luz/ día: 12 horas.
- ❖ Viento: Sureste- Noreste.

- ❖ Nubosidad anual: 4.7/8.

**Fuente:**(CEYPSA, 20015)

## **2.2. RECURSOS MATERIALES**

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

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

### **2.2.2. Recursos tecnológicos**

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

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

- ❖ Guantes.
- ❖ Mascarillas
- ❖ Mandil.
- ❖ Ropa quirúrgica
- ❖ Estereomicroscopio (NIKON SMZ 745)
- ❖ Jeringuillas (5ml)

- ❖ Cloruro de sodio al 0.9%
- ❖ Micropipeta.
- ❖ Puntas desechables de micropipeta
- ❖ Cajas Petri
- ❖ Bisturí.
- ❖ Solución holding (minitub)
- ❖ Solución etilenglicol(minitub)
- ❖ Tubos de ensayo (BD Vacutainer)
- ❖ Gradillas
- ❖ Crioconservadora (Cryologic Freeze Control)
- ❖ Pajillas de 0.25
- ❖ Termo de nitrógeno líquido (SEMEX)
- ❖ Tapones de pajuelas de embriones
- ❖ Centrífuga (Centrifuge PLC series)
- ❖ Cofia

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

- ❖ Mandil
- ❖ Termo
- ❖ Guantes

#### **2.2.5. Materiales para laparotomía Exploración de ovarios**

- ❖ Xilacina
- ❖ Ketamina
- ❖ Hilo vicril
- ❖ Hilo seda
- ❖ Equipo de disección

- ❖ Campos quirúrgicas
- ❖ Antibióticos
- ❖ Lactato de ringer
- ❖ Reverin

## **2.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **2.3.1. Tipo de Investigación**

**DESCRIPTIVA:** La misma que consiste en la caracterización de un hecho o fenómeno con el fin de establecer su estructura o comportamiento en este caso es la crioconservacion de ovocitos de alpacas.

### **2.3.2. Metodología**

**NO EXPERIMENTAL:** La metodología es no experimental, debido a que únicamente se va a observar el fenómeno (crioconservacion de ovocitos de alpaca) tal y como se va dando, sin que sean manipulados o provocados intencionalmente por el investigadores.

### **2.3.3. Métodos y Técnicas**

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

### **2.3.4. Análisis estadístico**

Esta investigación está representada porcentajes

## 2.4. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

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

### 2.4.1. Protocolo de súper estimulación ovárica

Se aplicó un protocolo de súper estimulación ovárica a cada una de las alpacas con el fin de obtener una mayor cantidad de folículos y ovocitos por ovario.

#### CUADRO 6.- PROTOCOLO DE SÚPER ESTIMULACIÓN OVÁRICA EN ALPACAS

HORMONA	DIAS DE APLICACION	HORA DE APLICACION	DOSIS/APLICACIÓN DIA
FSH(Folltropin)	Día 1	6 am-18 pm	2,70ml(54mg)
FSH(Folltropin)	Día 2	6 am18 pm	1,50ml(30mg)
FSH(Folltropin)	Día 3	6 am-18 pm	1,10ml(22mg)

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Clavón Xavier, 2015

Se administró la hormona FSH (Folltropin) por un periodo de 3 días cada 12 horas aplicando un total de 5,30ml (106mg) a la alpaca.

### 2.4.2 Desarrollo de la investigación en el laboratorio

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

- La recolección de ovocitos se realizó por el método de aspiración folicular que consiste en la punción de los folículos superficiales con una aguja hipodérmica calibre 18 y una jeringa de 10ml.
- El líquido folicular obtenido de la aspiración folicular fue depositado en una caja petri estéril desechable la misma que contiene solución holding plus.
- Luego con el microscopio (estereoscopio) utilizando una micro pipeta se procedió a la captura del ovocito y se colocó en una caja petri estéril que contenía micro gotas de solución holding plus y de esta manera se obtiene los ovocitos de buena y mala calidad, una vez obtenido los ovocitos se seleccionan bajo microscopio estereoscopio, evaluado su apariencia general, citoplasma y células del cúmulo que los rodean.
- Mediante el estéreo microscopio identificamos la presencia de un promedio de 4 a 5 ovocitos en cada ovario de distinta calidad obteniendo un total 3 ovocitos tipo A y 1 tipo B y C de acuerdo a sus características morfológicas.
- Antes del llenado de las pajillas los ovocitos deben estar en una solución de holding o etilenglicol, en un tiempo de 5 a 7 minutos. Para llenar las pajillas se usa una jeringa, la cual se le adhiere la pajilla donde va a estar el ovocito. Para llenarla, primero se llena de solución de etilenglicol, luego un 25 espacio de aire; en el siguiente espacio deberá ir el ovocito en la solución (porción media de la pajilla), seguido de un espacio de aire y al final de solución de etilenglicol. De esta manera el ovocito queda situado en el segmento central de la pajueta entre las dos burbujas de aire. El aire que se le adhiere a la pajilla es para que al momento de transferir el ovocito no se quede en la pajilla y salga sin ningún problema. Al finalizar el llenado se debe sellar la pajilla al extremo donde no se encuentra el algodón dentro de la pajilla con la máquina selladora por calor, teniendo el cuidado de no dañarlo. Una vez sellado se procede al proceso de congelación.

- Preparación del equipo de congelamiento, se utiliza la crio conservadora y se llenó de nitrógeno líquido y se ubica en la curva- 3 °C de congelación lenta la misma que debe marcar -6 °C, es la temperatura óptima para colocar las pajillas previamente llenas y se dejan reposando en el equipo en un tiempo de 5 minutos y empieza la curva de congelamiento y se deja en el equipo de 1 a 2 horas.
- Al llegar al punto final de temperatura (-23 a -34°C) las pajillas son llevadas al tanque de congelamiento con nitrógeno líquido a -196°C.

#### **2.4.2.1. Post descongelación**

Este proceso se realiza a los 8 días de haber crio conservado en el cual se verificó la calidad y la viabilidad de los ovocitos. Siguiendo con el siguiente protocolo:

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

Luego de haber descongelado y observado en el estereomicroscopio a los ovocitos se realizó la categorización de acuerdo a sus características morfológica de la siguiente forma:

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

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

**Tipo C:** Cumulus desnudo y con citoplasma irregular con zonas oscuras.

En esta investigación se observó 3 ovocitos de Tipo A que tenían capas múltiples mayores a 4 y son compactas con un citoplasma homogéneo transparente los que se utilizó para realizar la crioconservación. De los tres ovocitos crioconservados como resultado a la pos descongelación se observó que un ovocito conservo una buena calidad de tipo A y no ocasiono problemas a la descongelación, mientras que los otros dos ovocitos son de tipo C si ocasionaron problemas a la descongelación.

## CAPÍTULO III

### 3.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

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

#### CUADRO.4.- OBTENCION DE OVOCITOS

OBTENCION DE OVOCITOS	
# De Ovarios	2
# De ovocitos por Ovario Izquierdo	5
# De ovocitos por Ovario Derecho	4
# De Folículos Aspirados	9
Ovocitos Maduros	3
Ovocitos Inmaduros	1
Total de ovocitos obtenidos	4

Fuente: Directa

Elaborado por: Clavon Xavier, 2015

En este cuadro se indica el número de ovarios utilizados, el número de folículos aspirados y el total de ovocitos obtenidos tanto maduros como inmaduros para el desarrollo de la investigación.

### 3.1. NUMERO DE OVOCITOS RECOLECTADOS

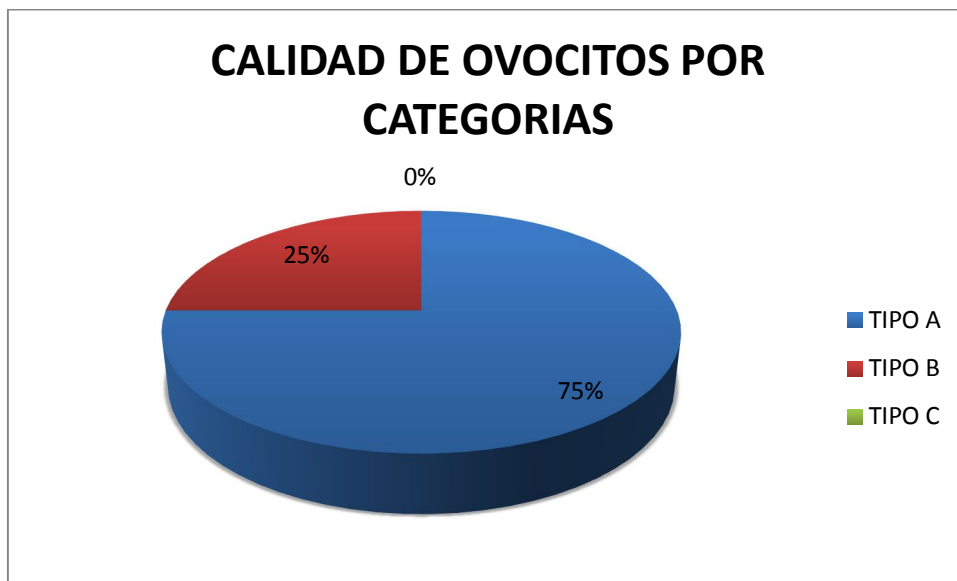
**CUADRO 5.- OVOCITOS RECOLECTADOS Y CATEGORIZADOS EN TRES TIPOS**

CLASIFICACIÓN	# DE OVOCITOS	PORCENTAJES (100%)
TIPO A	3	75
TIPO B	1	25
TIPO C	0	0
TOTAL	4	100

Fuente: Directa

Elaborado por: Xavier Clavon, 2015

**GRÁFICO 1. CALIDAD DE OVOCITOS POR CATEGORIA**



Fuente: Directa

Elaborado por: Clavon Xavier, 2015

En el cuadro 5 y gráfico 1 en relación al número de ovarios recolectados se pudo obtener 4 ovocitos, los cuales se encuentran distribuidos de la siguiente manera.

Tipo A con un total de 3 ovocitos que corresponde al 75% y mientras que tipo B con un total de 1 ovocitos que corresponde al ,25% y tipo C con un total de 0 ovocitos que corresponde al 0% de ovocitos obtenidos. Estos resultados difieren por (CLAVON, 2015) realizado en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi quien con la técnica de aspiración folicular mediante laparotomía obtuvo 0,75 % de tipo A y 0,25% de tipo B y C mientras que (GOMES, 2002) cita que con la Técnica de Aspiración Folicular mediante laparotomía se ha reportado más del 80% de ovocitos de categoría A.

### 3.2. ESTADO DE MADUREZ DE LOS OVOCITOS

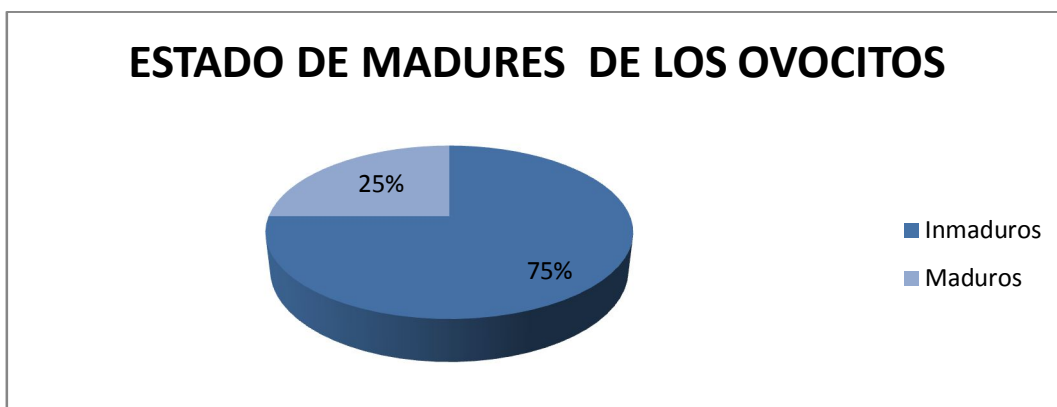
**CUADRO 6. ESTADOS DE MADUREZ DE LOS OVOCITOS**

ESTADOS MADUREZ	DE	OVOCITOS	PORCENTAJE (100%)
Inmaduro		3	75
Maduros		1	25

Fuente: Directa

Elaborado por: Clavon Xavier, 2015

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



Fuente: Directa

Elaborado por: Clavon Xavier, 2015

En el cuadro 6 y gráfico 2 de acuerdo al estado de madurez se determina que: 3 ovocitos tipo A son inmaduros los mismos que representa un 75% y mientras que en el 1 ovocitos tipo B y C son maduros los cuales representan un 25% los cuales no son aptos para realizar la crioconservación. Estos resultados difieren a los reportados por (GOMES, 2002) cita que con la Técnica de Aspiración Folicular mediante laparotomía se ha reportado más del 80% de ovocitos de categoría A.

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

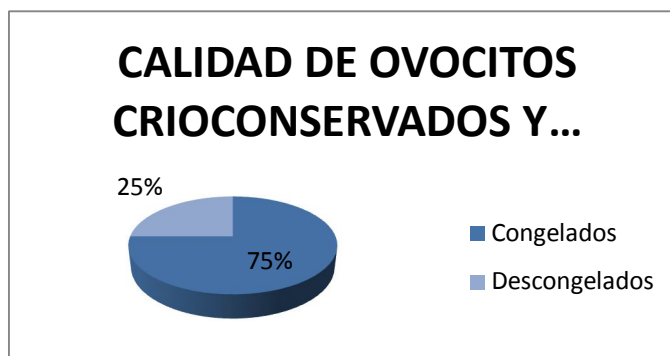
**CUADRO 7. CALIDAD DE OVOCITOS CRIOCONSERVADOS Y POST DESCONGELADOS**

Clasificación	Características morfológicas	# De ovocitos congelación	# De ovocitos descongelados
Tipo A	Capas múltiples(4)	3	1
Tipo B	1-3 Capas múltiples	0	0
Tipo C	Expandidas	0	0
TOTAL	-	3	1

Fuente: Directa

Elaborado por: Xavier Clavon, 2015

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



Fuente: Directa

Elaborado por: Xavier Clavon, 2015

En el cuadro 7 y gráfico 3 se determina la calidad de los ovocitos crioconservados y post descongelados, en los cuales se puede demostrar que 3 ovocitos Tipo A son crioconservados y durante la post descongelación se observó 1 ovocito Tipo A en

el esteromicroscopio se verificó que no ocasiono cambios morfológicos y conservó su calidad, y los otros 2 ovocitos se observó cambios morfológicos y no conservo su calidad luego de la exposición a las soluciones de etilenglicol , lo que ha demostrado que los ovocitos de alpacas son más sensibles al efecto toxico de etilenglicol.

Estos resultados son contradictorios con aquellos en ovocitos de bovinos, donde se reportan un 6% de ovocitos dañados por exposición a las soluciones vitrificantes (DINNYES, 2000) lo que demostraría que los ovocitos de alpacas son más sensibles al efecto toxico de etilenglicol.

No obstante, se dispone de un reporte en cabras donde la frecuencia de ovocitos dañados fue similar a la del presente estudio (BEGIN, 2003).

## **CONCLUSIONES**

- En esta investigación se logró determinar la evaluación de la crioconservación de ovocitos en alpacas teniendo en cuenta que fue la

primera investigación realizada en el Laboratorio de Biotecnología de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi en la cual hubo resultados exitosos.

- Los resultados de este estudio permiten destacar la importancia de crio conservar material genético de esta especie a fin en lo que favorecerá tanto a productores, técnicos y sobre todo a estudiantes que deseen realizar otros tipos de investigaciones.
- Dentro de los parámetros de calidad de los ovocitos se establece los siguientes resultados, de 2 ovarios procedentes de una alpaca se obtuvieron 4 ovocitos los mismos que son clasificados de acuerdo al: TIPO A: 3 ovocitos que corresponden al 75%, TIPO B: 1 ovocitos que corresponden al 25% y los de TIPO C: 0 ovocitos que corresponden al 0%.
- De acuerdo al estado de madurez se obtuvo los siguientes resultados, 3 ovocitos Tipo A son inmaduros los mismos que representan un 25%, mientras que el 1 ovocitos Tipo B y C son maduros con un porcentaje de 25%.
- Dentro de la crioconservación y descongelación se determinó que 3 ovocitos Tipo A fueron crioconservados y luego fueron descongelados los mismos que un ovocito si conservo su calidad de tipo A mientras que los dos ovocitos resultaron dañados por la exposición a las soluciones toxicas de etilenglicol y no se crioconservaron.
- Se ha podido incrementar el material bibliográfico de la reproducción ya que se deja plasmado en este trabajo el protocolo de la evaluación y crioconservación de ovocitos en alpacas.

## **RECOMENDACIONES**

- ✓ Existe una limitada disponibilidad de ovarios de alpacas provenientes de mataderos lo cual impide mayor investigación en la estandarización de una técnica de crioconservación de ovocitos de alpacas. por lo que es una buena opción la recolección de ovocitos mediante la técnica de aspiración folicular mediante laparotomía exploratoria, teniendo en cuenta la presencia de elementos foliculares que puedan afectar el proceso.

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

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Castañeda Martinez - 2011 - repository.lasalle.edu.co Fisiología de la reproducción desde la fecundación hasta la implantación embrionaria.
2. David Vantman, B. Margarita Vega, Dra. Revista Médica Clínica Las Condes Volumen 21, Issue 3, May 2010, Pages 348–362
3. CHRIS, DAVID. E, AMDERSON. 2015 Llamas y Alpacas Atención Medica Cirugía, Reproducción. Lima: s.n.
4. Fernández. Reyes .Mayo – ago. 2007 Revista de Salud Animal versión ISSN 0253-57°.

5. FELMERR, Producción in vitro de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. Arch. Med. Vet, 2009; 38(2): pp.97-104.
6. FERNY. 2014. 12 tp://es.slideshare.net/FernyBoada/reproduccion-en-camelidos-29935384.
7. GARCÍA W, PEZO D. SAN MARTIN F. OLAZABAL J, FRANCO F. 2005.4. GARCÍA W, PEZO D. SAN MARTIN F. OLAZABAL J, FRANCO F. *Manual del Técnico Alpaquero*. Lima : s.n., 2005. págs. 9- 30. ISBN. 9972- 47 – 113 – 6..
8. García, W. Y E. Cana, E. A paz. Manual de empadre controlado de alpacas Lima: Soluciones Prácticas, 2009
9. Hafez, Fuente: E.S.E. *Reproducción e Inseminación artificial*. s.l. : Séptima Edición. Fuente: E.S.E. Hafez. *Reproducción e Inseminación artificial*. Séptima Edición.
10. PALMA, G. MVZ. 2011.15. *P Biotecnología de la Reproducción*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2011.
11. Leal LS, Moya-Araújo CF, Fernandes CB, Martins LR, Landim-Alvarenga FC, Oba E. Evaluation of recovery, quality and *in vitro* nuclear maturation of oocytes obtained from Buffalo and Bovine Ovaries. 9no Congreso de búfalo, Argentina 2010.
12. López- Mazza .2010, Fac. Agronomía- E.E.B.R.
13. Marías-Álvarez, RM García-García, PG Rebollar... - ITEA, 2007 - [aida-itea.org](http://aida-itea.org) Desarrollo folicular en la coneja.
14. MUCCIN, Memoria técnica curso de graduación: PIV de embriones bovinos aspectos técnicos y biológicos. Balcarce, Buenos Aires: 2010.
15. Ray L. Nebel. Frozen 2010 Semen Storage & Handling. VCES Dairy Guidelines 404-032. Pro-fessor and Extension Dairy Scientist, Reproduction, Department of Dairy Science, Virginia Tech, Blacksburg. <http://www.dasc.vt.edu>

16. Rahman, A.N.M.A., Abdullah, R.B., Wan-Khadijah, W.E. 2008. *In vitro* maturation of oocytes special reference to goat: A Review. *Biotechnology*. 7: 599-611.
17. Ruiz JA. 2008. Avances en biotecnología reproductiva aplicada en la hembra de los camélidos sudamericanos. En: Quispe E (ed). Actualidades sobre adaptación, producción, reproducción y mejora genética en camélidos. 1ª ed. Universidad Nacional de Huancavelica, Perú, Pp 49-82.
18. Ruiz, E Tarifeño, A Llanos-Rivera... - Revista de biología..., 2008 - SciELO Chile.Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)
19. Sánchez de Mirt En Blogger desde noviembre de 2008 ATLAS DE MICOLOGÍA MÉDICA
20. HINCAPIÉ J, Memoria técnica curso de Graduación: Preparación de las columnas de percoll. Honduras, 2010.
21. INTAMemoria técnica curso de graduación: Producción in vitro criopreservación de embriones bovinos. Argentina, Balcarce: 2010 Junio, pp. 1-85.
22. Jaramillo, O Goicoechea, O Garrido... - Archivos de medicina..., 2009 - SciELO ChileSalmo salar: morfología ultraestructural de la pared del corion en ovas normales y con problemas de eclosión
23. VILCA. 2008.*Presentación Camélidos y Población San Pablo. Riobamba-Ecuador*. Riobamba-Ecuador. : s.n., 2008.
24. WILBER GARCIA. 2009 Manual de Técnicas Alpaquero

#### **REVISTAS:**

- A. A Medrano, WV Holt - Archivos de zootecnia, 1998 - dialnet.unirioja.es

- B. Dr. Lars Johansson por su ayuda en la preparación de este manual. © Copyright MediCult a/s, Denmark, 2005.
- C. PRODUCCIÓN AGROPECUARIA/ Sanidad Animal, Mayo 2010, p. 41 – 44 Copyright © 2010. Universidad Nacional Experimental Sur del Lago.
- D. REV. FAC. AGRON. (luz). (2010). Evaluación del Desarrollo Embrionario de Ovocitos Bovinos Madurados y Fecundados in vitro obtenidos a partir de hembras mestizas. ISBN: 7456128910
- E. LM Ávila-Portillo, JI Madero, C López... - Revista colombiana de ..., 2006 - scielo.org.co
- F. Manual Técnico de Llamas y alpacas , Segunda Edición © (2012)
- G. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú versión impresa ISSN 1609-9117, Rev.investig. vet. Perú v. 23 | Lima 2012

**CITADA DE INTERNET:**

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

## **ANEXOS**

**FOTO. 1.- ADMINISTRACION DE LA HORMONA FSH (FOLTROPION)**



**ELABORADO POR:** Clavon Xavier, 2015

**FOTO. 2.- ASPIRACIÓN DEL LÍQUIDO FOLICULAR**



**ELABORADO POR:** Clavon Xavier, 2015

**FOTO.3.- EN EL LABORATORIO CON EL CONTENIDO DEL LÍQUIDO FOLICULAR**



**ELABORADO POR:** Clavon Xavier, 2015

**FOTO.4.- LAVADO CON LA SOLUCION HOLDING**



**ELABORADO POR:** Clavon Xavier, 2015

**FOTO.5.-OBSERVACION DE OVOCITOS MEDIANTE ESTEREOMICROSCOPIO**



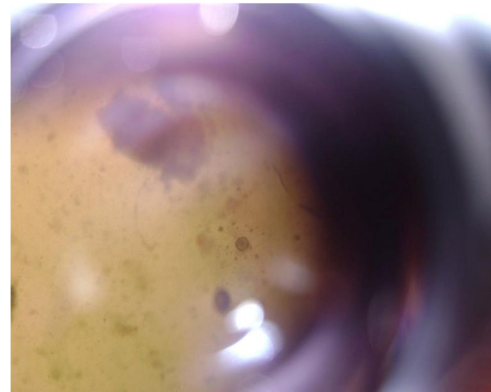
**ELABORADO POR:**Clavon Xavier, 2015

**FOTO.6.- EVALUACIÓN DE CALIDAD DE LOS OVOCITOS**

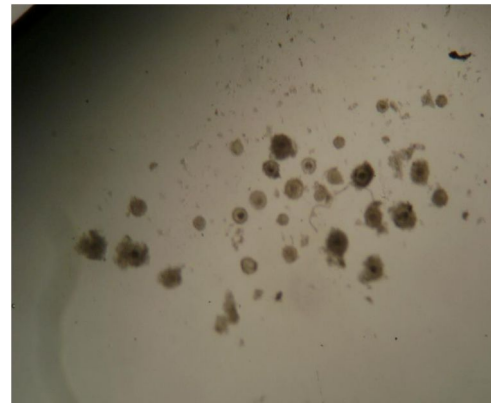
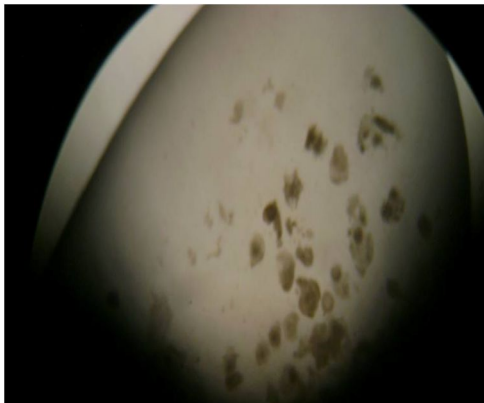
**TIPO A**



**TIPO B**



**TIPO C**



**ELABORADO POR:**Clavon Xavier, 2015

**FOTO.9.- VISITA DE TRIBUNAL**



**ELABORADO POR:** Clavon Xavier, 2015

