



**“Evaluación de la Calidad de Ovocitos Obtenidos por Aspiración Folicular en Ovarios
de Matadero y Aspiración Folicular in-vivo para su Fecundación en Reproductoras
Girolando”**

Jonathan Eduardo, Alvarado Morocho y Bryan Patricio, Torres Cedeño

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

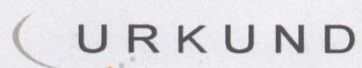
Carrera de Ingeniería Agropecuaria Santo Domingo

Trabajo de Titulación, previo a la Obtención del Título de Ingeniería Agropecuaria.

Dr. Félix Agustín Valdivieso Plaza

Santo Domingo – Ecuador

Diciembre del 2020

**Urkund Analysis Result**

Analysed Document: TESIS (Alvarado J, Torres B).docx (D88559003)

Submitted: 12/9/2020 3:17:00 PM

Submitted By: jealvarado5@espe.edu.ec

Significance: 1 %

Sources included in the report:

http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5394/1/Tesis%20%E2%80%9CEVALUACI%C3%93N%20DE%20LA%20EXPANSI%C3%93N%20DE%20LAS%20C%C3%89LULAS.pdf?fbclid=IwAR1hgpV6Bzk5qwEKDOC8pP_MBnocHXWIT69iZvzpP2eX3zX1gimHs4AxI4Gordon

Instances where selected sources appear:

2

Santo Domingo de los Tsáchilas, 11 de diciembre del 2020



Dr. Félix Agustín Valdivieso Plaza

C.C. 1301910871



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA SANTO DOMINGO

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE OVOCITOS OBTENIDOS POR ASPIRACIÓN FOLICULAR EN OVARIOS DE MATADERO Y ASPIRACIÓN FOLICULAR IN-VIVO PARA SU FECUNDACIÓN EN REPRODUCTORAS GIRORLANDO” fue realizado por las señores **Alvarado Morocho Jonathan Eduardo y Torres Cedeño Bryan Patricio** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 11 de diciembre del 2020



Dr. Félix Agustín Valdivieso Plaza

C.C. 1301910871



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA SANTO DOMINGO

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Nosotros, **Alvarado Morocho Jonathan Eduardo** y **Torres Cedeño Bryan Patricio**, con cédulas de ciudadanía n°0502869589 y 2350206682, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE OVOCITOS OBTENIDOS POR ASPIRACIÓN FOLICULAR EN OVARIOS DE MATADERO Y ASPIRACIÓN FOLICULAR IN-VIVO PARA SU FECUNDACIÓN EN REPRODUCTORAS GIRORLANDO"** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 11 de diciembre del 2020

.....
Alvarado Morocho Jonathan Eduardo

C.C.0502869589

.....
Torres Cedeño Bryan Patricio

C.C. 2350206682



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA SANTO DOMINGO

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Nosotros, **Alvarado Morocho Jonathan Eduardo** y **Torres Cedeño Bryan Patricio**, con cédulas de ciudadanía n°0502869589 y 2350206682, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE OVOCITOS OBTENIDOS POR ASPIRACIÓN FOLICULAR EN OVARIOS DE MATADERO Y ASPIRACIÓN FOLICULAR IN-VIVO PARA SU FECUNDACIÓN EN REPRODUCTORAS GIRORLANDO”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 11 de diciembre del 2020

Alvarado Morocho Jonathan Eduardo

C.C.0502869589

Torres Cedeño Bryan Patricio

C.C. 2350206682

DEDICATORIA

A Dios nuestro creador principalmente, por haberme permitido culminar una meta importante en la formación de mi vida profesional.

Les dedico este trabajo mis amados padres Luis Alvarado y Lourdes Morocho, que con ayuda de ellos logre culminar este trayecto universitario, brindándome valores, enseñanzas y consejos necesarios durante mi vida, demostrándome siempre su cariño y apoyo incondicional en todo momento para ser un profesional.

A mi hermano Steveen Alvarado y familia en general, por su apoyo incondicional y por todos los momentos buenos y malos compartidos a lo largo de mi vida.

A todos mis amigos y docentes que estuvieron presentes durante el proceso de mi formación universitaria, brindándome conocimientos y experiencias para ser un profesional de bien y éxito

Jonathan

En primer lugar, agradezco a Dios por haberme guiado en el camino correcto para poder alcanzar todas mis metas establecidas y culminar mi carrera profesional.

Les atribuyo todo este trabajo a mis amados padres Patricio Torres y Cecilia Cedeño, quienes han sido un grandioso tesoro en mí vida, por su sacrificio, amor sincero, porque gracias a ellos he logrado la profesión tan anhelada que ahora tengo y que a pesar de ser personas humildes y trabajadoras se esforzaron mucho para apoyarme y hacer de mí un hombre de bien, por eso y por todo lo que siempre me han ayudado le pido a mi Dios y Virgen del Cisne que me los bendiga y me los cuide por siempre.

A mis hermanos Boris Torres y Josué Torres y familiares en general quienes son una parte fundamental en mi vida a quienes le debo respeto y gratitud por ser un ejemplo para mí, cuyos apoyos e inspiración fue importante para alcanzar mis metas.

A todos y cada uno de mis amigos y docentes que estuvieron presentes en los duros momentos del proceso de formación universitaria, quienes me brindaron sus conocimientos y experiencia para ser un profesional exitoso en la vida.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Extensión Santo Domingo por tener excelentes docentes que supieron transmitir todo conocimiento, técnicas y experiencias para nuestra formación académica.

A nuestro director de tesis Dr. Félix Valdivieso por todos los conocimientos brindados, tiempo y paciencia en cada etapa de este proyecto de investigación.

Al Ing. Andrés Vargas por su valiosa predisposición de tiempo y asesoramiento en la fase de laboratorio y campo realizada en el proyecto de investigación.

Al Dr. Gelacio Gómez, Dr. Fabian Villavicencio e Ing. Vinicio Uday por su importante colaboración en mi proyecto de investigación.

A la Economista Mercedes Montero por todos los consejos sobre la vida diaria y profesional que debemos realizar para ser los mejores profesionales.

A mi compañera de alegrías y tristezas Leidy, que durante este tiempo me brindo apoyo incondicional en todo momento para logra cumplir esta meta de vida.

Al grupo de amigos Alex R, Diego C, Cristian F, Fabian C, Jonathan Z, por su apreciable amistad, apoyo y compañerismo durante este trayecto universitario, gracias por su confianza y todas las experiencias compartidas.

Jonathan

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Extensión Santo Domingo por permitirme desarrollar mis conocimientos para mi vida profesional.

A nuestro director de Tesis Dr. Félix Valdivieso por brindarnos todos sus conocimientos en cada etapa del desarrollo de nuestra investigación.

Al Ing. Andrés Vargas por la disponibilidad de tiempo, apoyo y colaboración en la etapa de campo y laboratorio en nuestra investigación.

Al Dr. Gelacio Gómez, Dr. Fabian Villavicencio e Ing. Vinicio Uday por su colaboración en la etapa de redacción de nuestra investigación, brindándonos su conocimiento en el área estadística.

A mi compañera Katy Menéndez por ser una amiga incondicional durante toda mi carrera de estudiante, a mis amigos Muñoz R, Sarango E, Stalin R, Pacheco J, Demera L, por los momentos únicos e inolvidables de compañerismo y experiencias vividas.

INDICE DE CONTENIDO

CARATULA.....	1
ANÁLISIS URKUND	2
CERTIFICACIÓN	3
RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA	4
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN	5
DEDICATORIA.....	6
AGRADECIMIENTO.....	8
INDICE DE CONTENIDO	10
INDICE DE TABLAS.....	15
INDICE DE FIGURAS	16
RESUMEN	17
SUMMARY	18
CAPITULO I.....	19
Introducción	19
Hipótesis.....	21
<i>Hipótesis Alternativa</i>	21
<i>Hipótesis Nula</i>	21
CAPITULO II.....	22
Revisión de literatura	22
Anatomía Y Fisiología Del Aparato Reproductor De La Hembra Bovino	22

	11
Ovarios	22
Ciclo estral	23
<i>Ovogénesis</i>	24
<i>Ovocito</i>	25
Clasificación de ovocitos.....	26
Recolección y Transporte de Ovarios	27
<i>Obtención de los Ovocitos</i>	27
Obtención de Ovocitos Post-Mortem.....	28
<i>Método De Aspiración</i>	28
<i>Aspiración de líquido folicular</i>	28
<i>OPU (ovum pick up)</i>	28
<i>Descripción de la Técnica</i>	29
Factores que Afectan la Calidad de los Ovocitos	31
<i>Edad del Animal</i>	31
<i>Categoría de los Animales y Ciclo Estral</i>	32
<i>Condición del Animal</i>	32
<i>Factores Ambientales</i>	32
<i>Tipo de Raza</i>	32
<i>Factores Medioambientales</i>	33
<i>Factores Animales</i>	33

<i>La selección de la hembra donante</i>	33
Tamaño de los ovarios	34
Esquemas de clasificación morfológica	34
Clasificación Ovocitaria	34
Calidad de embriones.....	35
CAPITULO III.....	36
Materiales y métodos	36
Ubicación del área de investigación.....	36
<i>Ubicación política</i>	36
<i>Ubicación Geográfica</i>	36
<i>Ubicación Ecológica</i>	37
Materiales.....	38
<i>Materiales de laboratorio</i>	38
Métodos.....	40
<i>Preparación de Medios In Vitro para Embriones</i>	40
<i>Manejo de reproductoras</i>	43
<i>Obtención y transporte de ovarios post mortem para recuperación de ovocitos</i>	43
Obtención de ovocitos en reproductoras Girolando	44
<i>Búsqueda y captura de ovocitos</i>	45
<i>Sistema de producción in vitro de embriones</i>	45

<i>Maduración in vitro de ovocitos (MIV)</i>	45
<i>Fecundación in vitro (FIV)</i>	46
<i>Cultivo in vitro (CIV)</i>	46
<i>Análisis estadístico</i>	46
<i>Determinación económica</i>	47
<i>Variables de estudio</i>	47
CAPITULO IV	49
Resultados	49
Clasificación de la calidad de ovocitos	49
Fecundación de Ovocitos	51
Clivaje de cco's	53
Costo - Beneficio	55
CAPITULO V	57
Discusión	57
CAPITULO VI	60
Conclusiones y Recomendaciones	60
Conclusiones	60
<i>Con respecto a la variable clasificación de calidad de ovocitos</i>	60
<i>Con respecto a la Tasa de fecundación de los ovocitos</i>	60
<i>Con respecto al Clivaje</i>	60

Recomendaciones	61
CAPITULO VII	62
Bibliografía	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Estado de Desarrollo</i>	35
Tabla 2. <i>Calidad de los embriones</i>	35
Tabla 3. <i>Materiales Utilizados en Preparación de Medios de Cultivo In Vitro.</i>	38
Tabla 4. <i>Materiales Utilizados en Punción Folicular de Ovocitos de Matadero</i>	39
Tabla 5. <i>Materiales Utilizados en Punción Folicular de Reproductoras Girolando</i>	39
Tabla 6. <i>Medio de Maduración In Vitro</i>	40
Tabla 7. <i>Medio de Cultivo de Embriones SOF (Synthetic Oviductal Fluid-SOF)</i>	41
Tabla 8. <i>Medio TALP-Hepes (holding)</i>	42
Tabla 9. <i>Medio para FIV Corta (Fertilización in vitro)</i>	42
Tabla 10. <i>SWS (Solución para lavado de semen)</i>	43
Tabla 11. <i>SDS (Diluyente de semen)</i>	43
Tabla 12. <i>Numero de ovocitos recolectados por Aspiración Folicular y OPU</i>	49
Tabla 13. <i>Numero de ovocitos fecundados y no fecundados provenientes de Aspiración folicular y Opu</i>	51
Tabla 14. <i>Estado y calidad de los cco´s rescatado por Aspiración folicular y Opu</i>	53
Tabla 15. <i>Análisis económico de los métodos de aspiración folicular para ovocitos</i>	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Cambios Ováricos y Hormonales Durante el Ciclo Estral en la Vaca.</i>	23
Figura 2. <i>Diagrama de la Ovogenesis.</i>	24
Figura 3. <i>Estructura del Ovocito</i>	26
Figura 4. <i>Tipos de Ovocitos por su Calidad</i>	27
Figura 5. <i>Punción de Folículos.</i>	28
Figura 6. <i>Equipos necesarios para realizar (OPU) (A: Ecografo, B: Transductores, C: Tipos de agujas, D: Sistema de guía para la aguja, E: bomba de aspiración).</i>	30
Figura 7. <i>Mapa de ubicación geográfica de donde se desarrollará la investigación.</i>	37
Figura 8. <i>Comparación en calidad de ovocitos rescatados por Aspiración folicular y Opu</i>	50
Figura 9. <i>Comparación de oocitos Fecundados y No Fecundados provenientes de Aspiración folicular y Opu.</i>	52
Figura 10. <i>Comparación final de la calidad y estadios de los cco's provenientes de ovarios de matadero y reproductoras girolando.</i>	54

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la calidad de ovocitos bovinos rescatados a partir de dos métodos: aspiración folicular en ovarios de matadero y aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU) en vacas Girolando. El estudio se realizó en el laboratorio de reproducción animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE" ubicada en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, parroquia Luz de América. Para el análisis estadístico se empleó la prueba de Chi-cuadrado con dos tratamientos, se emplearon 15 donantes de la raza Girolando y 300 ovarios de mataderos, la recuperación de los ovocitos se realizó con agujas descartables 18G para ovarios de matadero y 20G para las donantes en OPU, con una presión de vacío 80- 90 mmHg, determinando las siguientes variables (Calidad de ovocitos, fecundación y clivaje). Los resultados manifiestan 45,9% (Aspiración Folicular) y 32,1 % (OPU) con calidad intermedia (B), calidad bueno (A) no existió diferencia significativa 25,8% (OPU) y 25,7% (Aspiración folicular), para calidad mala (C) 28,4% (Aspiración Folicular) y 42,1% (OPU). De acuerdo con el análisis de Costo-Beneficio de esta Investigación se obtuvo un valor \$ 2,50 para el tratamiento de OPU (*Ovum pick up*) y Aspiración Folicular de 2,45\$. Se concluye que las fuentes de recuperación ovocitaria influyen en las calidades de ovocitos, pero con procesos de maduración y clivaje similares.

Palabras claves: *Recuperación, Ovocitos, Clivaje, Aspiración folicular, OPU*

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the quality of rescued bovine oocytes using two methods: follicular aspiration in slaughterhouse ovaries and ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration (OPU) in Girolando cows. The study was carried out in the animal reproduction laboratory of the University of the Armed Forces "ESPE" located in the province of Santo Domingo de los Tsáchilas, Luz de América parish. For the statistical analysis, the Chi-square test was used with two treatments, 15 donors of the Girolando breed and 300 ovaries from slaughterhouses were used, the recovery of the oocytes was carried out with disposable needles 18G for slaughterhouse ovaries and 20G for donors OPU, with a vacuum pressure of 80-90 mmHg, determining the following variables (Quality of oocytes, fertilization and cleavage). The results show 45.9% (Follicular Aspiration) and 32.1% (OPU) with intermediate quality (B), with good quality (A) there was no significant difference 25.8% (OPU) and 25.7% (Aspiration follicular), for poor quality (C) 28.4% (Follicular Aspiration) and 42.1% (OPU). According to the Cost-Benefit analysis of this Investigation, a value of \$ 2.50 was obtained for the treatment of OPU (Ovum pick up) and Follicular Aspiration of \$ 2.45.

It was concluded that the sources of oocyte retrieval influence oocyte qualities, but with similar maturation and cleavage processes,

Keywords: *Recovery, Oocytes, Cleavage, Follicular aspiration, OPU*

CAPITULO I

Introducción

La última década del siglo pasado, se caracterizó por ser un período relevante para el mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales. En los actuales momentos vivimos la era de la clonación y la transgénesis, existiendo muchos estudios dirigidos al mejoramiento de estas herramientas biotecnológicas (Pelaez, 2011).

Las biotecnologías aplicadas a la reproducción animal, han concedido a mejorar genéticamente los productos obtenidos de los animales domésticos, especialmente se han enfocado en mejorar la fertilidad y producción bovina (Collantes, 2011).

Dentro de las nuevas biotecnologías se encuentra la recuperación de gametos por aspiración folicular (OPU) y por aspiración folicular en ovarios de vacas de alto valor genético post mortem (Collantes, 2011).

La técnica In vitro de embriones es la introducción al área de la reproducción animal, donde suceden procesos fisiológicos de maduración y fecundación de ovocitos y el desarrollo temprano del embrión. Esta técnica tiende a potencializar la capacidad de multiplicación de animales con alto merito genético en especial las hembras ya que la colecta de ovocitos se puede realizar consecutivas veces, incluyendo animales gestantes sin efectos en su capacidad productiva o reproductiva (Gomez, 2006).

La aplicación de los procedimientos de fertilización in vitro (FIV) en la reproducción bovina se han incrementado en los últimos años y en un futuro pueden llegar a ser utilizados en programas de gran escala de producción comercial de embriones In vitro (Ramírez & Jiménez, 2015).

El empleo de estas biotecnologías reproductivas se ven limitadas por factores como: la falta de formación y capacitación de profesionales, poca inversión en el sector pecuario y sobre todo la falta de proyectos de investigación orientados a validar y enlazar estas tecnologías a

nuestro medio, dando como consecuencia bajos índices en los parámetros productivos y reproductivos que no han permitido alcanzar un desarrollo sostenible y adecuado en la producción bovina, repercutiendo indudablemente en la economía de los ganaderos del país (Ortega, 2016)

Con el presente estudio se evaluara una alternativa biotecnológica que es la "recuperación de ovocitos bovinos a partir de dos métodos: aspiración folicular en ovarios de matadero y aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU) en vacas Girolando, con el fin de producir embriones In-vitro; la validez y economía de dicha técnica hacen una opción viable para el aprovechamiento de ovocitos de calidad, en el cual se genere ingresos económicos adicionales a las personas dedicadas a la explotación de bovinos, a la vez que mantiene una fuente extraordinaria de ovocitos de animales con alto mérito genético y formar bancos de germoplasma para la conservación de las especies consideradas (Collantes, 2011).

Para el desarrollo de la investigación se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Evaluación de la calidad de ovocitos obtenidos por aspiración folicular en ovarios de matadero y aspiración folicular in vivo para su fecundación en reproductoras Girolando.

Objetivos específicos

- Comparar la calidad y clivaje de ovocitos obtenidos de ovarios de mataderos y de vacas Girolando mediante la técnica de (OPU).
- Analizar el costo-beneficio de los dos métodos de recuperación de ovocitos en la raza Girolando y de matadero.

El trabajo de investigación se realizó en dos fases, la fase de campo se realizó desde agosto 2020 hasta septiembre 2020 y la fase de laboratorio en los meses de octubre y noviembre del 2020.

Hipótesis

Hipótesis Alternativa

Ha: Existe diferencia significativa entre los dos métodos de obtención de ovocitos a partir de ovarios de matadero y ovocitos de reproductoras Girolando.

Hipótesis Nula

Ho: No existe diferencia significativa entre los dos métodos de recuperación de ovocitos a partir de ovarios de matadero y ovarios in vivo reproductoras Girolando.

CAPITULO II

Revisión de literatura

Anatomía Y Fisiología Del Aparato Reproductor De La Hembra Bovino

Anatómicamente el tracto reproductivo de la vaca se encuentra debajo del recto, el último segmento del intestino grueso. El aparato reproductor de la vaca comprende los ovarios, oviductos, útero, cérvix, vagina, vulva.

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, el número de partos mide aproximadamente de dos a cuatro centímetros de largo por uno a dos centímetros de ancho. En el ovario activo se distingue dos capas. Una capa cortical (córtez ovárico) donde tendrá lugar el desarrollo de los folículos y de los ovocitos y en la que se encuentran también células secretoras de hormonas. Y una segunda zona o capa medular con tejido conectivo, vascular y nervioso. En el testículo masculino, por el contrario, la producción de espermatozoides y hormonas se llevan a cabo en el interior de este. La capa cortical del ovario en todas las hembras de animales domésticos, excepto en la yegua, está ocupada por los folículos ováricos en distintas fases de evolución. Esta capa queda envuelta por la túnica albugínea (membrana fibrosa que envuelve al ovario). dicha túnica se va infiltrando en profundidad hasta definir el estroma ovárico que mantiene los folículos en evolución (Chamba & Ortega, 2016).

Funciones: Gametogénesis (función exocrina) Formación de ovocitos Síntesis de hormonas (función endócrina):

- Estrógenos (Folículos)
- Progesterona (Cuerpo Lúteo)
- Inhibina
- Oxitocina

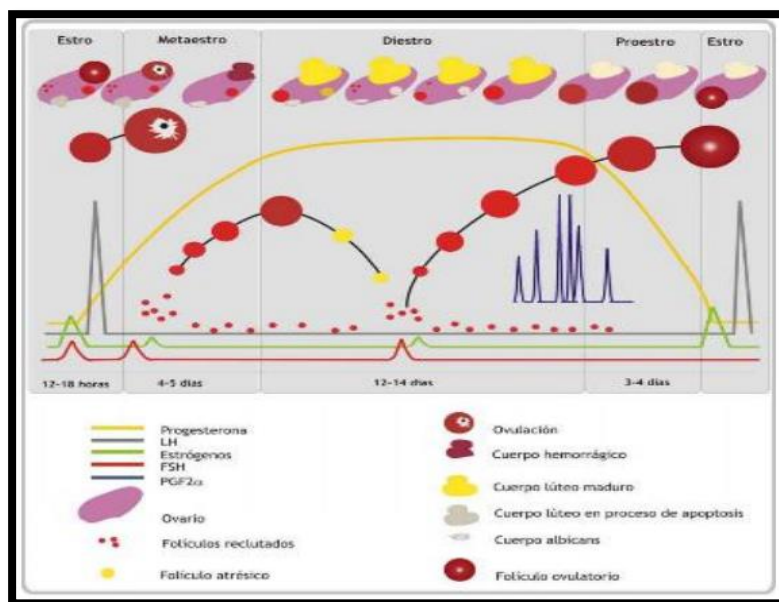
- Relaxina. (h) (Chamba & Ortega, 2016)

Ciclo estral

Es el periodo de tiempo que transcurre entre dos celos y dura en promedio 21 días su rango es de 17 a 24 días. En el transcurso del ciclo estral los ovarios sufren una serie de cambios q finalizan con la ovulación y la expulsión de ovocitos capacitado para ser fecundados, estos cambios están regulados por diversas hormonas procedentes de distintos órganos (hipotálamo, hipófisis, ovario y útero). La GnRH es una hormona de origen hipotalámico que estimula en la adenohipófisis la secreción de FSH y la de LH, la FSH es responsable del inicio de la oleada del crecimiento folicular al estimular el reclutamiento mientras que la LH interviene en la maduración final del folículo dominante y en la ovulación (Chamba & Ortega, 2016).

Figura 1.

Cambios Ováricos y Hormonales Durante el Ciclo Estral en la Vaca.



Fuente: (Hernandez, 2006).

Ovogénesis

La ovogénesis es el proceso de formación, crecimiento y maduración de los gametos femeninos. La etapa de su formación se realiza durante la vida fetal (Ordoñez, 2005)

Desde la etapa de la formación embrionaria se forman los gametos femeninos. De células indiferenciadas se generan las células germinales primordiales (Byskov, 1982). Las células germinales primordiales migran a la cresta genital, para formar el futuro ovario. Estas células se multiplican por mitosis y una parte de estas se diferenciarán y formarán las ovogonias, a partir de las que se formarán el ovocito (Gondos, 1978).

El ovario de la hembra recién nacida contiene muchos ovocitos, detenidos nuclearmente en la primera división de la meiosis (ovocitos primarios) y rodeado por el estroma epitelial ovárico formando folículos primordiales. El número de gametos que poseen las hembras domésticas está fijado desde el mismo momento de su nacimiento, y durante toda la vida del animal se irán liberando. Hay 150 mil en el vacuno al nacimiento, a los tres meses en terneras es de 75 000 y a los 10 años 2 500 folículos primordiales (Delgado, 2017).

Figura 2.

Diagrama de la Ovogénesis



Fuente: (Hernandez, 2006).

Foliculogénesis

El ovocito primario se encuentra rodeado de una pequeña capa de células epiteliales constituyendo el folículo primordial para convertirse luego en folículos primarios, estos constan del ovocito rodeado de una capa de células cuboides que presentan gran actividad mitótica (González, 2012).

Debido a las gonadotropinas hipofisarias, las mitosis de las células epiteliales que rodean el ovocito y el crecimiento de este ocurren paralelamente. Las células epiteliales se multiplican y crecen disponiéndose en varias capas constituyendo el folículo grado dos o pre-antral. Las secreciones de estas células producen mucopolisacáridos, por influencias hormonales, que se dispondrán alrededor del ovocito formando una membrana llamada zona pelúcida (González, 2012).

Mientras tanto el núcleo del ovocito sigue en reposo, aunque la actividad citoplásmica es intensa, cargándose de productos nutritivos, que son suministrados a través de las células que rodean el ovocito. Alrededor del folículo se disponen unas estructuras de tejido conjuntivo que se entrelazan a modo de barrera, constituyendo las tecas, que completarán su formación en el siguiente estadio folicular (Zuckerman, 1962).

Las células foliculares responden al estímulo de la FSH hipofisaria secretando sustancias como son metabolitos, hormonas esteroideas etc., que se van a acumular en el folículo formando una cavidad llamada antro folicular, lo que constituye el folículo antral (Zuckerman, 1962). Cuando las células foliculares son capaces de responder al estímulo de la hormona FSH en síntesis, se conoce con el nombre de células de la granulosa.

Ovocito

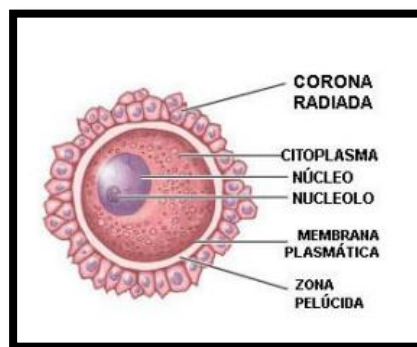
En organismos animales, los gametos proceden de una estirpe celular específica llamada línea germinal que da lugar a las células germinales primordiales y que en etapas tempranas del desarrollo se diferencian y originan ovocitos y espermatozoides. Los ovocitos de

mamíferos se encuentran rodeados de varias capas de células que constituyen el cúmulus ophorus (Paredes, 2015)

El grado de crecimiento ovocitario se relaciona directamente con el número de células de la granulosa que lo rodean. También se ha propuesto que las células del cúmulus, después de la maduración del ovocito, pueden ayudar a guiar al espermatozoide hacia el ovocito justo antes de la fecundación, aunque no ha llegado a demostrarse este extremo. La ruptura de las células del cúmulo se lleva a cabo por diferentes enzimas liberadas por los espermatozoides (Roca, Hill, Viudes de Castro, & Vicente, 2009)

Figura 3.

Estructura del Ovocito



Fuente: (Palma, 2013)

Clasificación de ovocitos

Se los puede clasificar en tres tipos:

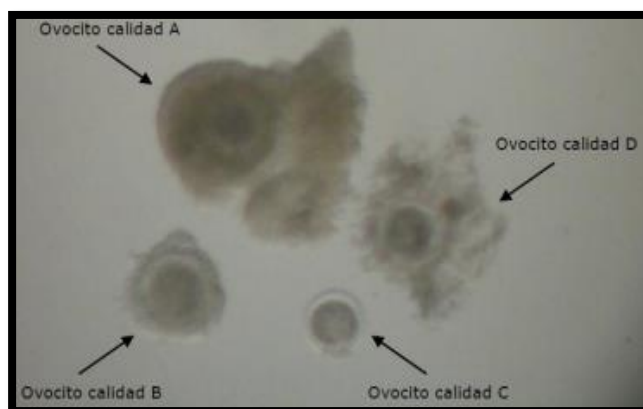
Tipo A: ovocito con células de cumulus con capas múltiples mayor a cuatro, compactas y con citoplasma homogéneo y transparente.

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

Tipo C: cumulus desnudado con citoplasma irregular con zonas oscuras.

Figura 4.

Tipos de Ovocitos por su Calidad



Fuente: (Janke, West, & Youngs, 2015).

Recolección y Transporte de Ovarios

Obtención de los Ovocitos

La obtención de los ovocitos se puede realizar de vacas procedentes de dos fuentes:

- A partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios donde se debe realizar inmediatamente después de la muerte del animal, el transporte se lo realiza en soluciones salinas-tampón o fosfato-salinas (PBS) con antibióticos (González, 2012).
- A partir de animales vivos utilizando la aspiración transvaginal eco guiada (OPU). Se puede recoger ovocitos en las hembras de más de seis meses de edad, durante los primeros tres meses de gestación y a partir de la segunda y tercera semana del postparto, por lo que no interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de las hembras donantes. En el caso de hembras muy jóvenes (menos de seis meses de edad) es necesario recurrir a la laparoscopia (González, 2012).

Obtención de Ovocitos Post-Mortem

Método De Aspiración

Aspiración de líquido folicular

La obtención de los ovocitos por aspiración de los folículos antrales es la técnica más empleada en la recuperación ovocitaria en ovarios de matadero; sin embargo, se sabe que de todos los folículos puncionados sólo se recupera el 30 o 60% de ovocitos. La ventaja de la absorción folicular se basa en la velocidad y la facilidad operacional, factor importante en una unidad comercial de producción de embriones.

La aspiración folicular se la puede realizar con agujas 18 a 22 G` empatadas en jeringas de tres o diez milímetros (**Alvarado J. , 2017**).

Figura 5.

Punción de Folículos



OPU (ovum pick up)

Un sistema de aspiración folicular guiado por ultrasonografía está compuesto por un ecógrafo con transductor, una bomba de aspiración y una aguja, además posee un sistema de guía que es conectado a un recipiente de recolección y una sonda cuyo diseño posibilita la manipulación de la aguja de punción desde el exterior así como poder ser visualizada para penetrar los folículos ubicados cerca del transductor (Corredor & Páez, 2012)

Descripción de la Técnica

La técnica aspiración folicular mediante (OPU) se realiza ubicando la cabeza del transductor inmediatamente caudal al cérvix y según el ovario a puncionar se colocará a la derecha o la izquierda. El dispositivo se manipula desde el exterior de la vaca con una mano mientras que la otra mano es introducida en el recto para fijar el ovario contra el transductor visualizándose el ovario y los folículos en la imagen ecográfica; una vez fijado el ovario, la aguja es visualizada en el sector y con movimientos suaves y cuidadosos es perforada la pared vaginal y los folículos, cuyo contenido es aspirado por la bomba de vacío y recolectados (Corredor & Páez, 2012)

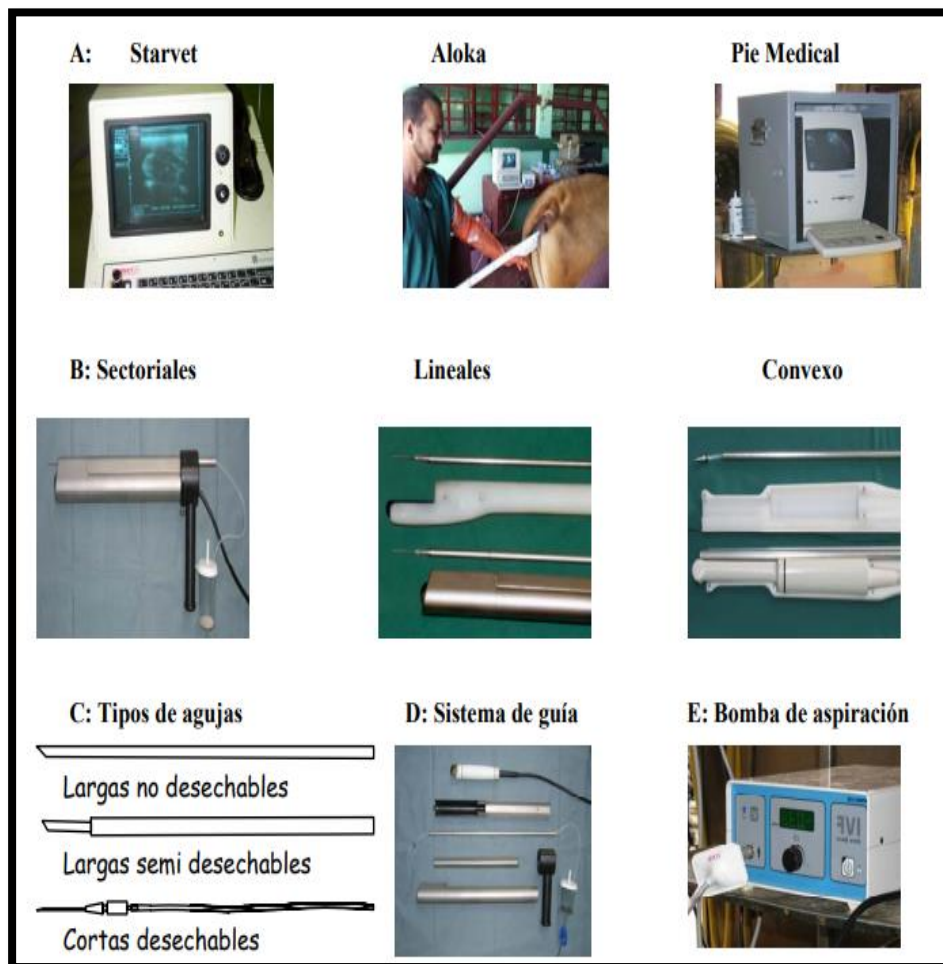
Para la realización de esta técnica el transductor o sonda es colocado en un soporte rígido de 50 centímetros que contiene la guía de la aguja de punción. Las agujas se introducen por una guía adaptada a la parte plástica o metálica que sujeta el transductor, una bomba de vacío permite realizar la presión de aspiración necesaria para recolectar el contenido de los folículos puncionados; presiones entre 50 y 85 milímetros de mercurio, han sido reportadas con buenos resultados (Denis, 2008).

Existen tres tipos de agujas, las largas de uso único, las cortas de inyección (desechables) y un sistema semi desechable en el cual se cambia la punta de las agujas largas por agujas cortas desechables, las largas (35 a 60 centímetros) tienen el inconveniente que pierden el filo con facilidad, por lo que es necesario cambiarlas entre vaca y vaca, son muy caras y el ovocito debe transitar una gran distancia por una superficie metálica, las cortas son también de uso único pero muy baratas, constituyendo un sistema más práctico. Las agujas de bisel corto suelen ser más eficaces, ya que, la tasa de recolección es mayor y el daño a las células del cúmulo menor (Bols P. , 1997).

En el caso del sistema semi desechable, se han reportado daños en la calidad de los ovocitos recolectados, debido a la toxicidad de los fundentes utilizados y longitud metálica por donde debe transitar el ovocito (Bols P. , 2005).

Figura 6.

Equipos necesarios para realizar (OPU) (A: Ecógrafo, B: Transductores, C: Tipos de agujas, D: Sistema de guía para la aguja, E: bomba de aspiración).



Para la realización de (OPU) resulta indispensable disponer de tres componentes: un equipo de ultrasonido (ecógrafo) con su respectivo transductor, una bomba de aspiración y un sistema de guía de aguja conectado a un tubo colector (Figura 6).

En la actualidad existe una gran variedad de marcas de ecógrafos muchos de los cuales se han especializado en el diseño de transductores (sectoriales, convexos o lineales) apropiados para realizar (OPU) capaces de trabajar incluso con dos frecuencias. Justo antes de iniciar el acto de la punción algunos equipos de trabajo prefieren sedar las hembras con

hidrocloruro de detomidina (Domocedan) vía endovenosa, a razón de un mg/100 kg de peso vivo y/o (Buscopan) hyoscine-N-butylbromide utilizado como relajante intestinal antes de aplicar la anestesia epidural (Denis, 2008)

Factores que Afectan la Calidad de los Ovocitos

Edad del Animal

En la obtención de ovocitos de animales muy jóvenes o viejos, no todos ellos se comportan de la misma manera al momento de la maduración in vitro, estudios han demostrado que los ovocitos provenientes de terneras requieren una mayor atención en cuanto a sustratos empleados para su maduración. Los ovocitos obtenidos de hembras pre-púberes resultan ser menos competentes que su contraparte adulta (Gordon, 2003).

Las tasas de viabilidad de los ovocitos obtenidos de hembras pre-púberes son bajas comparadas con las que se pueden obtener de los ovocitos provenientes de animales de mayor edad (vaconas y vacas) debido a que estos ovocitos los de las hembras pre-púberes son más pequeños en diámetro; metabolizan la glutamina y el piruvato a una tasa más baja, muestran una declinación temprana en la síntesis de proteína, contienen más microvelocidades sobre la superficie celular, mayor cantidad de vesículas endocíticas y menos mitocondrias (Gordon, 2003).

Del mismo modo, la vejez está relacionada con la declinación de la fertilidad en muchas de las especies de mamíferos, en bovinos se observa a partir de los 13 años. La vejez maternal, disminuye las tasas de fertilización y clivaje, y está relacionada con cambios foliculares y endócrinos. La vejez reproductiva en el ganado está asociada con una elevada circulación de gonadotropinas lo que reduce la concentración de hormonas esteroideas, además se reclutan folículos menores a cuatro y cinco milímetros por onda folicular; la vejez de la hembra también está relacionada con la disfunción mitocondrial (Alvarado J. , 2017).

Categoría de los Animales y Ciclo Estral

Al realizar estudios entre vacas y hembras púberes, ambas categorías de animales respondieron de similar manera. Investigaciones han establecido que la fase del ciclo estral puede influenciar el potencial desarrollo de los ovocitos y la producción in vitro de embriones, además cuando los ovarios se encuentran bajo la influencia de un cuerpo lúteo (fase luteal) se puede recuperar ovocitos de muy buena calidad; así mismo, los ovocitos obtenidos de donadoras que se encuentren entre los días 14 y 16 del ciclo producen una mayor cantidad de blastocistos (Gordon, 2003).

Condición del Animal

La nutrición de la hembra bovina afecta la competencia de desarrollo de los ovocitos y embriones. Los cambios en las dietas generan un rápido cambio en el microambiente ovocitario afectando los mecanismos de la función y performance reproductiva como el metabolismo de las proteínas, biosíntesis del ácido ribonucleico y oxidación de los ácidos grasos (Moussa, Shu, Zhang, & Zeng, 2015); dietas que generen altas cantidades de amoníaco circulante en el plasma, afectan la producción de ovocitos (Gordon, 2003).

Factores Ambientales

El estrés calórico afecta grandemente el performance productivo y reproductivo de los bovinos. Investigaciones realizadas determinaron que en el trópico y en las estaciones calurosas, la calidad de los ovocitos disminuye en vacas de origen europeo comparadas con las de origen índico Hansen, y otros, (2001), otros estudios realizados indican que el desarrollo de los ovocitos es sensible a la temperatura.

Tipo de Raza

La calidad y cantidad de ovocitos bovinos también se ve afectada por el tipo de ganado, es así como en animales procedentes del *Bos taurus* las tasas de fertilización son menores que en las hembras procedentes del *Bos indicus*. Así mismo, el *Bos indicus* puede generar el doble de la cantidad de ovocitos viables comparado con el *Bos Taurus* (Evans, y otros, 2012).

Factores Medioambientales

El estrés calórico afecta grandemente el performance productivo y reproductivo de los bovinos, en el trópico y en las estaciones calurosas, la calidad de los ovocitos disminuye en vacas de origen europeo comparadas con las de origen índico (Alvarado J. , 2017).

Factores Animales

De acuerdo con estudios realizador por Snijders, Dillon, Callaghan, & Boland, (2000) el mérito genético de las vacas afecta la calidad de los ovocitos. Vacas con alto mérito genético producen ovocitos de más baja calidad que las vacas con merito genético medio.

Adicionalmente, la cantidad de folículos antrales en la descendencia está influenciada por el estatus lactacional y la calidad de la leche, pero no es afectada por la producción de leche.

La calidad y cantidad de ovocitos bovinos también se ve afectada por el tipo de ganado, es así como en animales procedentes del *Bos Taurus* las tasas de fertilización son menores que en las hembras procedentes del *Bos Índicus*. Así mismo, el *Bos Índicus* puede generar el doble de la cantidad de ovocitos viables comparado con el *Bos Taurus* (Hansen, y otros, 2001).

La selección de la hembra donante

Es importante hacer una adecuada selección de la hembra donante ya que esta interviene directamente en los resultados obtenidos tras la aplicación de la técnica. Además de la superioridad genética en estas, se deben tener en cuenta los siguientes factores como ciclos estrales regulares, precocidad reproductiva, dos o menos servicios por concepción en los años anteriores, comportamiento individual superior a la media del grupo en características de importancia productiva (peso al destete, al año y a los dieciocho meses), que produzca crías superiores a la media del hato, especialmente comparado con las hermanas de la hembra (descendientes del mismo toro), ningún problema al parto, ninguna irregularidad reproductiva, así como ningún defecto genético o de conformación detectable (Bó, y otros, 2002).

Tamaño de los ovarios

La cantidad de ovocitos recuperados esta correlacionado positivamente con el tamaño y peso del ovario. En vacas adultas jóvenes con un recuento de folículos antrales bajo, tiene un 60% de ovarios pequeños, 80% de folículos y ovocitos menos saludables morfológicamente y 45% menos de folículos y ovocitos saludables por gramo de ovario demostrando que el tamaño de las reservas ováricas de ovocitos es dramáticamente inferior en hembras jóvenes con un bajo conteo de folículos antrales comparado con las hembras que presentan un conteo de folículos antrales alto (Alvarado J. , 2017).

Esquemas de clasificación morfológica

El potencial de maduración nuclear y citoplasmática del ovocito está determinado ampliamente por las características del folículo de donde se los obtuvo; es así como, los ovocitos provenientes de folículos mayores a 8mm o menores de 2mm no son aptos para la maduración in vitro.

Luego de definir los folículos a ser incluidos en los programas de recuperación ovocitaria, hay que clasificar los ovocitos obtenidos, morfológicamente los ovocitos con mayor viabilidad deben presentar homogeneidad del citoplasma con granulaciones finas, color marrón y envueltos por varias capas compactas de células de cúmulos (Gonella, Atuesta, Bernal, & Chacon, 2013).

Clasificación Ovocitaria

La clasificación según el estado de desarrollo va desde el estadio "1" (ovocito sin fecundar) hasta el número "9" (Blastocisto expandido eclosionado); mientras que el estado cualitativo se clasifica del "1" (excelente/bueno) al "4" (muerto/degenerado) (Janke, West, & Youngs, 2015).

Tabla 1.*Estado de Desarrollo*

N°	Estado
1	No Fecundado
2	2 a 12 Células
3	Mórula temprana
4	Mórula
5	Blastocisto temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto eclosionado
9	Blastocisto eclosionado expandido

Fuente: (Janke, West, & Youngs, 2015).

Calidad de embriones

Para la calidad de embriones se tomó como referencia a la investigación de (Janke, West, & Youngs, 2015), teniendo la siguiente tabla.

Tabla 2.*Calidad de los embriones*

Código	Calidad
Código 1	Excelente o Bueno
Código 2	Regular
Código 3	Malo
Código 4	Muerto o Degenerado

Nota: En la tabla 1 y 2 se detalla todos los estadios embrionarios posibles en la clasificación 1-9 y la calidad celular que va de 1-4, marcada por la IETS. Obtenido de (Janke, West, & Youngs, 2015).

CAPITULO III

Materiales y métodos

Ubicación del área de investigación

La investigación se realizó en la Provincia de Santo Domingo de Tsáchilas, cantón Santo Domingo, Parroquia Luz de América, Hda. Zoila Luz ubicada en el km 24 de la vía Santo Domingo- Quevedo.

Ubicación política

- País: Ecuador
- Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas.
- Cantón: Santo Domingo.
- Parroquia: Luz de América.
- Sector: Hda. Zoila Luz

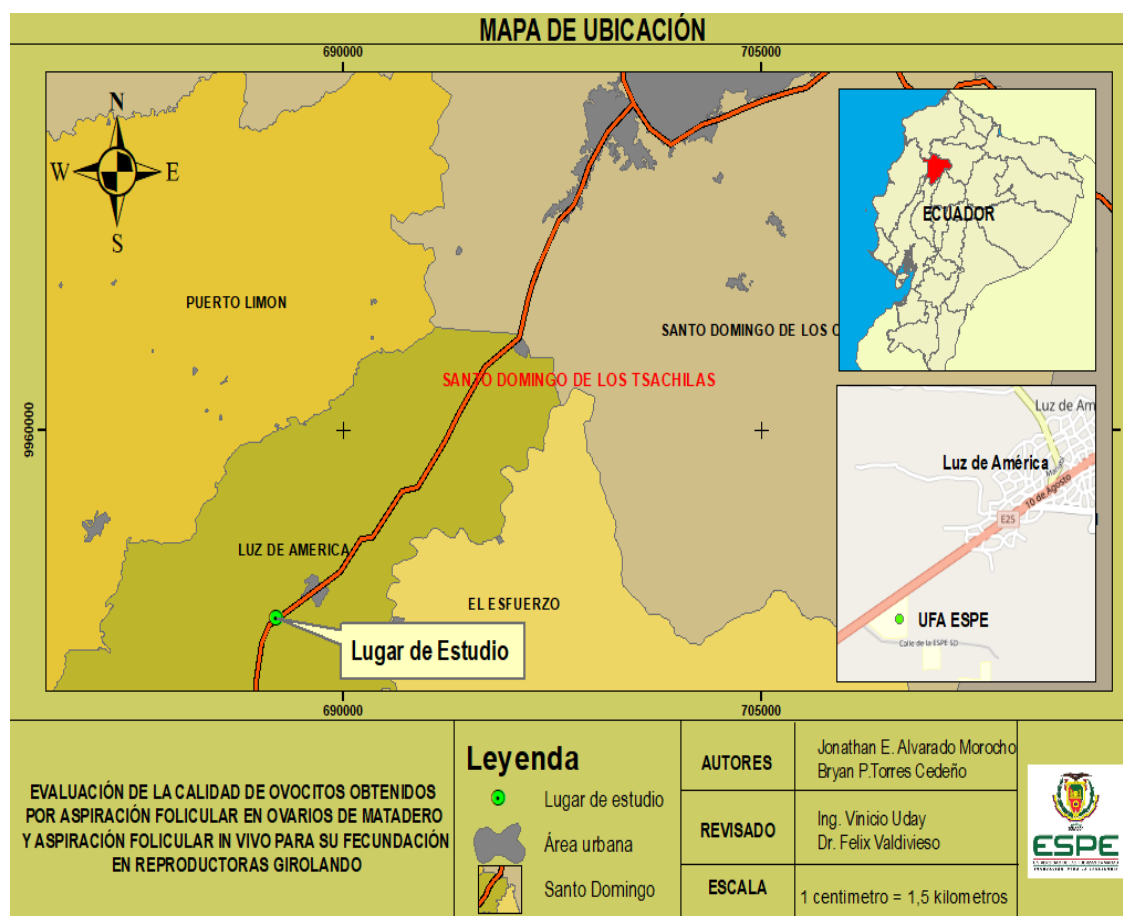
Ubicación Geográfica

La Hda. Zoila Luz se encuentra en la siguiente ubicación geográfica:

- Altitud: 270 msnm
- Coordenadas UTM: 688477 Norte, 9954241 Este

Figura 7.

Mapa de ubicación geográfica de donde se desarrollará la investigación.



Ubicación Ecológica

- Zona de vida: Bosque húmedo Tropical
- Altitud: 270 msnm
- Temperatura media: 24,6 ° C
- Precipitación: 2860 mm año
- Humedad relativa: 85%
- Heliófila: 739 horas luz año

Fuente: Estación Agro Meteorológica "Puerto Ila" Vía Quevedo km 34

Materiales

Materiales de laboratorio

Tabla 3.

Materiales Utilizados en Preparación de Medios de Cultivo In Vitro.

Materiales/Equipos	Reactivos	Muestra
Autoclave	Medio de maduración	Maduración in vitro Ovocitos
Cámara de flujo laminar	SOF (Synthetic Oviductal Fluid)	Fecundación in vitro Ovocitos
Estufa	TALP-Hepes	Cultivo in vitro Ovocitos
Centrifuga	SWS (Solución lavado semen)	
Incubadora (Co2)	SDS (Diluyente del Semen)	
Baño maría	Aceite mineral	
Balanza analítica		
Nevera		
pH metro		
Bortex		
Platina térmica		
Estereoscopio		
Microscopio		
Tubos falcón		
Hependor		
Cajas Petri 35mm		
Micropipetas		
Puntas (amarillas y azules)		

Tabla 4.*Materiales Utilizados en Punción Folicular de Ovocitos de Matadero.*

Materiales/Equipos	Reactivos	Muestra
Estereoscopio	Agua destilada	Ovarios de matadero
Vaso de precipitación (1000 ml)	TALP-Hepes	
Placas de Búsqueda		
Placa térmica		
Tijeras		
Pinzas		
Jeringuillas sin embolo (10ml)		
Guantes		
Agujas 18 G		
Papel absorbente		

Tabla 5.*Materiales Utilizados en Punción Folicular de Reproductoras Girolando*

Materiales/Equipos	Reactivos	Muestra
Estereoscopio	Suero Fetal Bovino	Ovocitos de Reproductoras
Ecógrafo (Mindray)	Heparina	
Transductor convexo 5 Mhs	TALP-Hepes	
Guía de aspiración	Lidocaína	
Gel de Ultrasonido	Alcohol	
Tijera		
Papel absorbente		

Métodos

Los ovarios de matadero se transportaron en un termo entre 35-37°C de temperatura controlada, desde la Empresa Municipal de Rastro en Santo Domingo de los Tsáchilas hasta la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, con un total de 300 ovarios (60 ovarios/día), donde se verificó la calidad y clivaje en ovocitos extraídos mediante la técnica de Aspiración folicular.

En la técnica Aspiración folicular in vivo se utilizaron 15 vacas de la raza Girolando de buen mérito genético, para la extracción de ovocitos se trabajó con una sesión por animal, es decir tres donantes por día durante cinco días.

Preparación de Medios In Vitro para Embriones

La formulación de los medios fue obtenida de LabBA 2017 (Universidad Buenos Aires).

Tabla 6.

Medio de Maduración In Vitro

Medio de Maduración	Cantidad
Volumen final	20 ml
TCM	0,19 gr
SFB	1 ml
Piruvato de sodio 1nM	10 ul
Cisteamina	10 ul
FSH	2 ul
antibiótico antimicótico	100 ul

Tabla 7.*Medio de Cultivo de Embriones SOF (Synthetic Oviductal Fluid-SOF)*

Medio de cultivo de embriones SOF	Cantidad
Volumen final	50 ml
NaCl	314,65 mg
KCl	26,7 mg
CaCl 2 H ₂ O	12,39 mg
KH ₂ PO ₄	8,1 mg
MgSO ₄ 7 H ₂ O	9,1 mg
Na HCO ₃	105,48 mg
Rojo Fenol	50 ul
Na Piruvato	18,15 mg
Na Lactato	72 ul
BSA – FAF	400 mg
BME	100 ul
MEM	50 ul
Na trici	5 mg
Mio Inositol	25 mg
SFB	2,5 %v/v
ATB/ATM	500 ul
H ₂ O	55 ml
pH	7,2 - 7,4

Nota: El medio SOF se pasa por filtro de 0,22 micras y se conserva en nevera hasta 30 días

Tabla 8.*Medio TALP-Hepes (holding)*

TALP-Hepes	Cantidad
H ₂ O	445 ml
NaCl	3,331 gr
KCl	0,1195 gr
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,147 gr
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,051 gr
ATB/ATM	5 ml
Rojo Fenol	0,5 ml
Na Lactate	0,72 ml
Na Pyruvate	0,5 ml
NaHCO ₃	0,084 gr
Hepes	1,19 gr
BSA	1,5 gr
Osmolaridad	275 +/-10mOsm/kg
pH	7,2 - 7,4

Tabla 9.*Medio para FIV Corta (Fertilización in vitro)*

Solución A	Cantidad	Solución B	Cantidad	BO	Cantidad
Volumen			15		
final	50 ml		ml		15 ml
NaCl	0,4309 gr	NaHCO ₃	0,1940 gr	Sol. A	11,4 ml
KCl	0,0197 gr	Rojo Fenol	3 ul	Piruvato Na	0,00206 gr
CaCl 2					
H ₂ O	0,0217 gr			Penicilina/estreptomicina	03 ml
NaH ₂ O	0,0084 gr			Sol. B	3,6 ml
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,0069 gr				
Rojo fenol	10 ul				

Tabla 10.*SWS (Solución para lavado de semen)*

SWS	Cantidad
Sol. BO	10 ml
Cafeína	40 mg
Heparina	10 ul

Nota: La solución SWS se puede conservar en nevera hasta 15 días

Tabla 11.*SDS (Diluyente de semen)*

SDS	Cantidad
Sol. BO	5 ml
BSA	100 mg

Nota: La solución SDS se puede conservar en nevera hasta 15 días

Manejo de reproductoras

Se procedió a seleccionar 15 reproductoras de la raza Girolando de considerable valor genético, durante dos meses previos a la punción folicular se suministró por cada donante sales minerales (150 gr), balanceado (2kg) diariamente y Calfosvit (20ml) cada tres días, con la finalidad de estimular y aumentar el desarrollo folicular.

Obtención y transporte de ovarios post mortem para recuperación de ovocitos

Se recolectaron 300 ovarios de la Empresa Municipal de Rastro ubicado en Santo Domingo de los Tsáchilas, los ovarios fueron transportados en Solución Salina y en un termo hermético con 35-37°C de temperatura controlada hasta el laboratorio de Reproducción Animal, en la Unidad de las Fuerzas Armadas ESPE; a un tiempo no mayor a dos horas (Collantes, 2011)

Ya en laboratorio se retiró cuidadosamente con una tijera los tejidos adyacentes, estructuras circundantes como ligamentos y tejidos adiposos evitando romper algún folículo, posteriormente dos limpiezas con solución salina estéril (Alvarado J. , 2017)

Para la obtención de ovocitos se toma el ovario con una toalla de papel procediendo a punzar los folículos antrales que tienen un diámetro entre tres y seis mm. La punción se realizó con una aguja 18G en una jeringuilla sin embolo de 10 ml, recolectando así el líquido folicular en un tubo falcón de 50 ml con solución de TALP-H (10ml) temperada a 37,5°C en un tiempo no mayor de dos horas. Una vez colectado el líquido folicular de los posibles ovocitos, se dejó decantar durante 10-15 minutos, para luego extraer con una pipeta el pellet con los presuntos ovocitos que fueron colocados en una caja de búsqueda temperada a 37°C y con medio TALP-H (2 ml) (Alvarado J. , 2017)

Obtención de ovocitos en reproductoras Girolando

Previo a la punción folicular (OPU), las reproductoras se deben encontrar tranquilas y en un área limpia para así proceder ingresar a la manga o jaula (potro de contención) donde se trabaja. Se evacua las fecas, para luego aplicar un anestésico vía epidural al 2% de lidocaína; posteriormente se precedió al aseo y desinfección minucioso de la vulva y región perianal (Pelaez, 2011).

El equipo de OPU como bomba de presión al vacío, transductor transvaginal son calibrados, lubricados y protegidos con una cubierta látex (chemis), Se realizo la aspiración de los folículos utilizando la técnica recto vaginal, manejando el porta zonda con la mano derecha y posterior mente la sujeción del ovario (mano izquierda), se visualiza en el ecógrafo el ovario posicionada vía rectal delante de la sonda y se da paso a la punción de todo folículo entre dos y seis milímetros con una presión de 80-90 mm Hg y aguja (20G 0´9 x 70mm) conectado por medio de la vía y guía al tubo falcón de 50 ml con 15 ml de medio (suero fetal bovino + heparina) debidamente temperado (37,5-37,8°C) (Mocha & Quezada, 2017).

El líquido folicular obtenido de la punción se recibe en el tubo falcón y una vez culminada la aspiración folicular transvaginal se guarda el tubo falcón en la bomba al vacío temperada a 37,8 °C para proceder a su filtrado del residuo de sangre. El filtrado del fluido obtenido se realiza con, Suero fetal bovino en un filtro de OPU donde los restos de sangre se eliminan por continuos lavados (dos a tres lavados) y así pasar a la placa Petri de búsqueda temperada (Pelaez, 2011).

Búsqueda y captura de ovocitos

Se realizo con placas Petri cuadriculadas de búsqueda temperadas en una placa termina a 37,8°C, colocando con la micropipeta 2 ml de TALP-H más el fluido extraído de los ovarios, se dejó sedimentar durante dos minutos, luego con la ayuda del Estereoscopio se buscó cuadrante por cuadrante todos los ovocitos que se encuentran, seleccionando únicamente los de grado uno y dos por presentar la mayor compactibilidad de las células del cúmulo, este proceso se realizó en un tiempo inferior a 60 minutos (Pelaez, 2011).

Sistema de producción in vitro de embriones

La producción in vitro de embriones bovinos se divide en tres procesos fundamentales, los cuales independientemente del protocolo a usar, en orden cíclico son Maduración de ovocitos, Fecundación de ovocitos y Cultivo de embriones (Ortega, 2016).

Maduración in vitro de ovocitos (MIV)

Los ovocitos recolectados son colocados en una caja Petri con TALP-H (3ml), con la finalidad de dar un lavado y así eliminar el fluido folicular que vehiculiza los ovocitos, así como posibles contaminantes provenientes del área de punción (Pelaez, 2011).

El medio de maduración es distribuido en una caja Petri de 30mm con cuatro microgotas de 100 ul, más tres milímetros de aceite mineral, para evitar la fricción y reducción de perdida de medio de maduración, llevar incubadora durante 20 minutos antes de la distribución de ovocitos. Los ovocitos son colocados entre 15 a 20 por cada microgota y

llevados a incubadora con parámetros controlados (37°C; 94% Humedad; 6% CO₂) durante 20 horas (INTA, 2010).

Fecundación in vitro (FIV)

El presente proyecto utilizó el proceso de FIV corta, donde se descongela pajuelas de semen en baño María a 37°C durante 30 segundos, todo su contenido se descargará en un tubo de 15 mililitros con tres mililitros de solución para lavado de semen (SWS) suplementada con heparina dos (ug/ml), éste se centrifuga por cinco minutos a 490 g, posteriormente se desecha el sobrenadante. Este procedimiento se realiza dos veces. El pellet obtenido se re suspende en SWS 200 ul y SDS 200 ul (Aller, Alberio, & Palma, 2000).

La concentración final de espermatozoides se ajusta en 16 millones/mililitros, adicionando igual volumen de SWS/SDS. Con la dilución final de semen se hacen microgotas de 100 ul y se cubrirán con aceite mineral previamente calibrado en incubadora gaseada. Los COC's son lavados en TALP-H con el objeto de eliminar el suero proveniente del medio de maduración y finalmente se colocan en las gotas conteniendo espermatozoides, en grupos de 20 a 25, finalmente se introduce a incubadora gaseada durante cinco horas (Aller, Alberio, & Palma, 2000).

Cultivo in vitro (CIV)

Al termino de cinco horas en fecundación los presuntos cigotos deben ser desnudados (eliminación de cúmulos), por lo cual son lavados en medio TAL-H (3ml) y pasados a cajas Petri en microgotas de 80 ul con medio SOF previamente gaseado en incubadora durante 20 minutos. En las microgotas de SOF se agregan de 20 a 25 presuntos cigotos y se coloca en incubadora (37°C; 94% Humedad; 6% CO₂) hasta el día 7 donde se evalúa el porcentaje de embriones (Pelaez, 2011).

Análisis estadístico

Los factores de estudio fueron dos métodos de recuperación de ovocitos: 1) Aspiración folicular en ovarios de matadero y 2) Aspiración folicular in de reproductoras Girorlando.

Se realizó la prueba de *Chi-cuadrado* para comparar las medias (X) entre los dos métodos de aspiración folicular, para establecer si existen o no diferencias significativas en la calidad y clivaje de los ovocitos recolectados con las dos técnicas de aspiración folicular

Fórmula general:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

Donde:

$\chi^2 =$ **Chi Cuadrado**

$f_o =$ **Frecuencias Observadas**. Estos son los datos obtenidos al hacer cada observación en la muestra real o física del estudio

$f_e =$ **Frecuencias Esperadas, o frecuencias teóricas** y van a ser el resultado de hacer las operaciones respectivas en el supuesto que la variable estudiada.

Determinación económica

La comparación de costos en los métodos aplicados para aspiración folicular se trabajó con la metodología de relación Costo-Beneficio.

Formula: $DE = \text{Beneficio} - \text{Costo}$

Variables de estudio

Clasificación ovocitaria

La clasificación ovocitaria se realizó de acuerdo con la figura N°4, basándonos en la investigación del cual menciona que existen 3 categorías para identificar los ovocitos, ubicándolos en escala de A-buenos, B-Intermedios, C-Malos.

Fecundación

Se desarrollo una vez terminado el MIV y de tener separados los espermatozoides viables se proporcionó un ambiente apto, para que ocurra la capacitación y fecundación. El cultivo fue realizado en un periodo de 18 a 22Horas con 39°C en una atmosfera de 6% CO₂ en aire con una duración de 7 días (Post-inseminacion), al cuarto día se realizó el recambio del

medio SOF y se examinaron las gotas y se separaron los embriones de los ovocitos o cigotos no divididos.

Clivaje de ovocitos

Se determino por medio de la tabla 1 y 2, mostrando el estado y la calidad de los ovocitos, marcada por el IETS, obtenida de la investigación de (Janke, West, & Youngs, 2015).

CAPITULO IV

Resultados

Clasificación de la calidad de ovocitos

En la tabla 12 se expresan los resultados de la clasificación de la calidad de ovocitos obtenidos, bajo los parámetros establecidos por (Hawk & Pared, 1994)

Tabla 12.

Numero de ovocitos recolectados por Aspiración Folicular y OPU

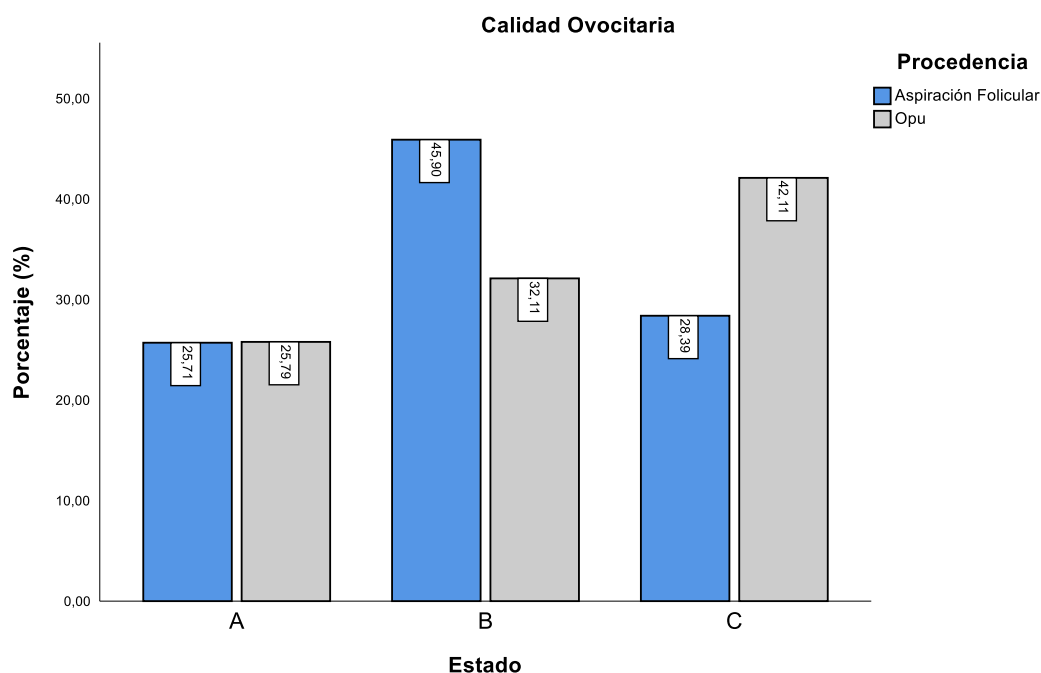
		Calidad Ovocitaria			Total	
		Buenos (A)	Intermedios (B)	Malos (C)		
Procedencia	Aspiración	No. Ovocitos	182	325	201	708
	Folicular	Porcentaje %	25,7%	45,9%	28,4%	100%
		No. Ovocitos	49	61	80	190
	OPU	Porcentaje %	25,8%	32,1%	42,1%	100%
		No. Ovocitos	231	386	281	898
	Total	Porcentaje %	25,7%	43%	31,3%	100%

La prueba de chi cuadrado muestra que existe diferencia significativa entre las dos fuentes de recuperación ovocitaria, en donde la aspiración folicular tiene mayor porcentaje en dos parámetros establecidos a diferencia de OPU. Consiguiendo ovocitos de calidad intermedia (43%) seguido de los ovocitos de mala calidad (31,3%) y finalmente los ovocitos de buena calidad (25,7%).

A continuación, se muestra la figura 10 el porcentaje de la calidad ovocitaria de los ovocitos rescatados en ovarios de matadero y reproductoras Girolando por los dos métodos de aspiración, se clasifica en grupo A (Buenos), B (Intermedio), C (Malos).

Figura 8.

Comparación en calidad de ovocitos rescatados por Aspiración folicular y Opu



En la figura 8 se observa que los ovocitos de calidad buena (A) tanto de aspiración folicular y OPU, no generaron diferencia significativa, caso contrario los ovocitos de calidad intermedia (B) existió un mayor porcentaje en aspiración folicular y finalmente hubo un mayor porcentaje de ovocitos de mala calidad (C) correspondiente a la técnica de OPU.

Fecundación de Ovocitos

Tabla 13.

Numero de ovocitos fecundados y no fecundados provenientes de Aspiración folicular y Opu

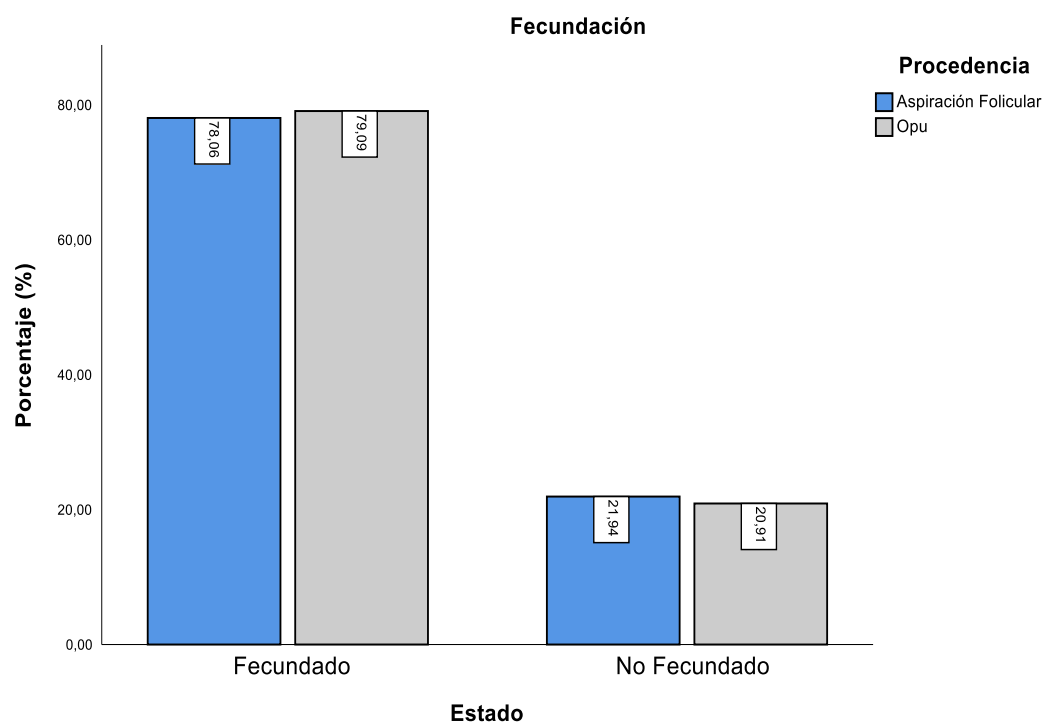
		Fecundados	No Fecundados	Total
Aspiración Folicular	No. Ovocitos	396	111	507
	Porcentaje (%)	78,10%	21,90%	100%
OPU	No. Ovocitos	87	23	110
	Porcentaje (%)	79,10%	20,90%	100%
Total	No. Ovocitos	483	134	616
	Porcentaje (%)	78,20%	21,80%	100%

Observando la tabla 13, indica que no hay diferencia significativa en la fecundación de los ovocitos de Aspiración folicular y OPU, donde el porcentaje de ovocitos de Aspiración folicular fecundados es de 78,2% (396 ovocitos) y 21,8 % (111 ovocitos) no fecundados, de igual manera de los 110 ovocitos totales obtenidos por OPU, se fecundan 79,1% (87ovocitos) y 20,9% (23 ovocitos) no fecundados.

A continuación, se muestra la figura 9 el porcentaje de ovocitos fecundados y no fecundados de Aspiración folicular y OPU.

Figura 9.

Comparación de ovocitos Fecundados y No Fecundados provenientes de Aspiración folicular y Opu.



En la figura 9 se observa que, no existe diferencia significativa con el número de ovocitos fecundados y no fecundados obtenidos por Aspiración folicular y OPU, es decir que no existe influencia alguna al momento de ser fecundados los ovocitos provenientes de ovarios de matadero y reproductoras Girolando.

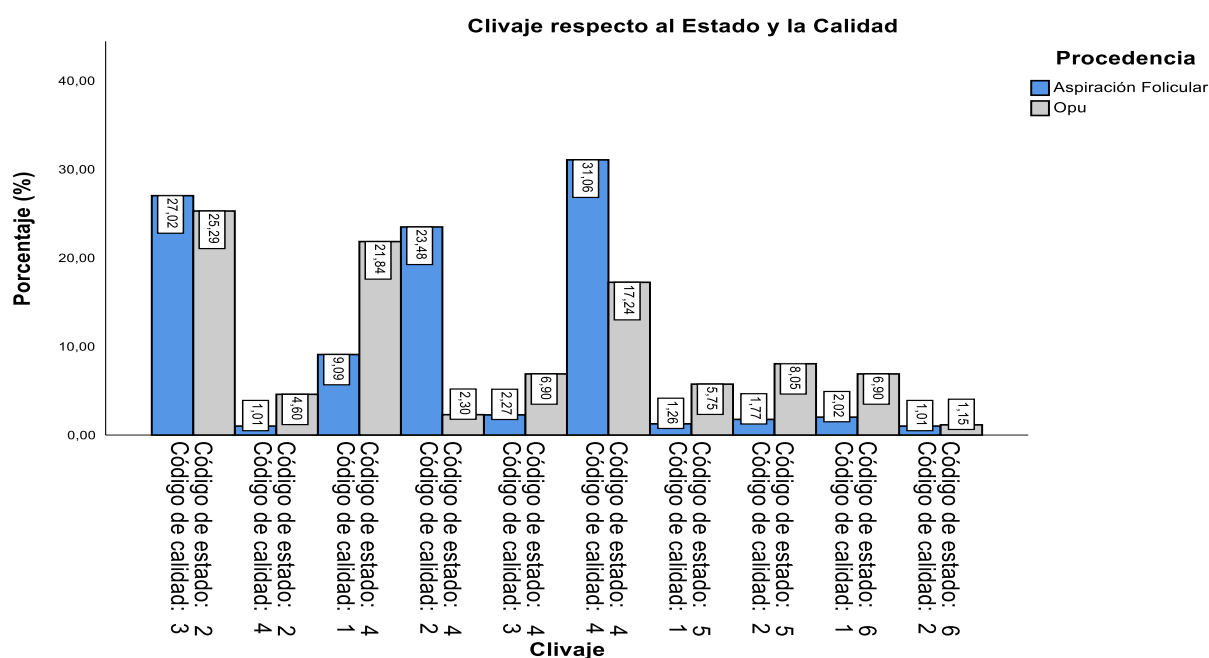
Clivaje de cco's**Tabla 14.***Estado y calidad de los cco's rescatado por Aspiración folicular y Opu*

Clivaje	Procedencia		Total	
	Aspiración Folicular	OPU		
Código de estado: 2	No. Ovocitos	107	22	129
Código de calidad: 3	Porcentaje (%)	27%	25,3%	26,7%
Código de estado: 2	No. Ovocitos	4	4	8
Código de calidad: 4	Porcentaje (%)	1%	4,6%	1,7%
Código de estado: 4	No. Ovocitos	36	19	55
Código de calidad: 1	Porcentaje (%)	9,1%	21,8%	11,4%
Código de estado: 4	No. Ovocitos	93	2	95
Código de calidad: 2	Porcentaje (%)	23,5%	2,3%	19,7%
Código de estado: 4	No. Ovocitos	9	6	15
Código de calidad: 3	Porcentaje (%)	2,3%	6,9%	3,1%
Código de estado: 4	No. Ovocitos	123	15	138
Código de calidad: 4	Porcentaje (%)	31,1%	17,2%	28,6%
Código de estado: 5	No. Ovocitos	5	5	10
Código de calidad: 1	Porcentaje (%)	1,3%	5,7%	2,1%
Código de estado: 5	No. Ovocitos	7	7	14
Código de calidad: 2	Porcentaje (%)	1,8%	8%	2,9%
Código de estado: 6	No. Ovocitos	8	6	14
Código de calidad: 1	Porcentaje (%)	2%	6,9%	2,9%
Código de estado: 6	No. Ovocitos	4	1	5
Código de calidad: 2	Porcentaje (%)	1%	1,1%	1%
Total	No. Ovocitos	396	87	483
	Porcentaje (%)	100%	100%	100%

Observando los resultados de la tabla 14, se encontró una diferencia en cuanto a los cigotos viables para ser empleados en programas de transferencias de embriones, los cuales son estadio 4 calidad1; estadio 6 calidad 1. Se obtuvo 21,8 % en estadio 4 calidad 1 para OPU y 9,1% en aspiración folicular, en estadio 6 calidad 1 OPU tiene 6,9% y Aspiración folicular 2%, también se obtuvo por aspiración folicular (31,1%), OPU (17,2%) de estadio 4 calidad 4, es decir que estos cigotos llegaron a un estado de mórula, pero se encontraban muertos o degenerados.

Figura 10.

Comparación final de la calidad y estadios de los cco's provenientes de ovarios de matadero y reproductoras Girolando



En la figura 10 se observa que no existieron diferencias estadísticas entre el desarrollo de los cigotos de estadio 2 calidad 3, tanto de los ovarios provenientes de matadero como el de las vacas Girolando, caso contrario donde se pudo reflejar un porcentaje mayor de cigotos viables para seguir el proceso de maduración fue en los cigotos de las reproductoras con 21,84% de estado 4 y calidad 1, estadio 6 calidad 1 con 6,9%.

Costo - Beneficio**Tabla 15.***Análisis económico de los métodos de aspiración folicular para ovocitos.*

	Descripción	Aspiración Folicular			OPU		
		Cantidad	Valor Unitario	Valor Total	Cantidad	Valor Unitario	Valor Total
300 ovarios	Ovarios	300	\$ 0,25	\$ 75,00			
de Matadero	Transporte/día	5	\$ 5,00	\$ 25,00			
	Termo	1	\$ 10,00	\$ 10,00			
15	Calsfostvit				1	\$ 20,00	\$ 20,00
reproductoras	Sales minerales				8	\$ 4,50	\$ 36,00
Girolando	Anestésico (Lidocaína)				2	\$ 7,00	\$ 14,00
	Balanceado				20	\$ 23,00	\$ 460,00
	Pajuelas (Teutón ESPE Nacional)	5	\$ 8,00	\$ 40,00	5	\$ 8,00	\$ 40,00
	Punción Folicular Materiales	1	\$ 75,00	\$ 75,00			
	Equipo OPU Depreciación 5 años				1	\$ 166,50	\$ 166,50
	Medios de Producción (MIV, FIV, CIV)	3	\$ 300,00	\$ 900,00	3	\$ 300,00	\$ 900,00
	Utilización Laboratorio/Equipos	1	\$ 150,00	\$ 150,00	1	\$ 150,00	\$ 150,00
	Depreciación de 5 años						
Total/Egresos				\$ 1.275,00			\$ 1.786,50
	Embriones Producidos	44	\$ 100,00	\$ 4.400,00	25	\$ 250,00	\$ 6.250,00
Total/Ingresos				\$ 3.125,00			\$ 4.463,50
Utilidad neta				\$ 1.850,00			\$ 2.677,00
Relación Costo/Beneficio				\$ 2,45			\$ 2,50

En la tabla 15 se muestra el análisis económico de los dos métodos utilizados, punción folicular y OPU, donde muestra que el egreso total en punción folicular de \$ 1 275,00 y \$ 1 586,50 para OPU, de igual manera los ingresos varían de \$ 3 125,00 y \$ 4 463,50, con utilidades netas en aspiración folicular \$ 1 850,00 y para OPU \$ 2 677,00, esta diferencia es generada porque los embriones obtenidos de ovarios de matadero en este proyecto fueron del camal de Santo Domingo, en los cuales se desconoce su procedencia genética con una valor de venta \$ 100,00, en comparación de los provenientes de Reproductoras Girolando donde se seleccionó las donantes con alto merito genético con una valor de venta \$ 250,00. Los equipos utilizados y materiales de laboratorio se los presenta con una depreciación de cinco años, dando como resultado una relación costo/beneficio \$ 2,45 para aspiración folicular y \$ 2,50 para OPU.

CAPITULO V

Discusión

Los ovocitos de clase A y B recuperados de ovarios de matadero por medio de aspiración folicular fue de 71,6% y la tasa de ovocitos obtenidos de las reproductoras Girolando alcanzó 57,9% del total de los ovocitos recuperados por la técnica OPU entre las dos categorías. En un estudio realizado por Alvarado (2017), sobre la calidad de ovocitos provenientes de vacas de matadero y criollas, obtuvo una tasa de recuperación de 67,2% mediante la aspiración folicular y 55,7% por medio de la técnica OPU, dichos valores son menores a los obtenidos en el presente estudio, en el estudio realizado por Hashimoto, y otros (1999), reconoce que un mayor porcentaje de embriones producidos de ovocitos colectados de ovarios de matadero, debido a que estos están exentos de factores que limitan su calidad como la presión de vacío y el diámetro de la aguja utilizados durante la aspiración.

Esta diferenciación de datos puede estar influenciado a que los ovarios obtenidos en matadero proceden de hembras bovinas de diferentes edades y condiciones fisiológicas según Machatková (1996), a pesar del potencial que tienen los ovarios en producir ovocitos, concluyendo que la tasa de recuperación de ovocitos de matadero es muy limitada e irrepetible.

Con respecto a la calidad de los ovocitos de las reproductoras girolando recuperados mediante la técnica de OPU son relativamente iguales con la investigación realizada por Alvarado (2017), donde trabajo con vacas de raza criollas, caso contrario en la investigación de Manik & Palta (2003), obtuvieron un mayor número de ovocitos de calidad (A) del 32% mediante la técnica de OPU. De igual manera estos datos se ven influenciado por diferentes factores que afectarían en el éxito de la OPU, según Baruselli, y otros (2012), estos factores sería de aspecto técnicos como el tipo de equipo utilizado, experiencia del operador, el diámetro de la aguja, presión de vacío de aspiración, hasta aspectos biológicos como son la raza de las hembras a las que se les realiza la OPU, estado nutricional de los animales, estrés térmico, la aplicación de programas de tratamientos hormonales previos a la OPU.

Por otra parte los ovocitos malos (C) se obtuvieron un mayor número en los ovocitos recuperados por la técnica de OPU con un porcentaje 42,1% siendo mayor a los obtenidos en la investigación de la tasa de recuperación de ovocitos en vacas Holstein en descarte de Alvarado, Gamarra, Gallegos, & Samillán (2016), donde obtuvo 33,7% de ovocitos malos, estos fluctuación de resultados se debe a que dicho autor trabajo con una presión de vacío de -36 a -49 mm de Hg ocasionando un menor desprendimiento de la masa del cúmulo de los ovocitos. Corroborando con dicho autor Prendes, y otros (2002), menciona que el incremento de la presión de vacío aumenta el número de ovocitos inviiables, posiblemente por la pérdida de células de los cúmulos que rodea al ovocito, del mismo modo Bellenda (2003), afirma que en la punción transvaginal de folículos es importante considerar los niveles de presión de vacío a utilizar durante la aspiración folicular, ya que no solo afecta a la tasa de recuperación de ovocitos sino también a la calidad de estos.

Según Cutini, Teruel, & Cabodevilla (2000), considera que los ovocitos de grado A y B poseen un elevado potencial para el desarrollo de los posibles cigotos en la fertilización in vitro, sin embargo, el porcentaje de viabilidad para desarrollarse en embriones es del 24%. Para tener éxito en FIV, debe existir una culminación exitosa en MIV y semen de buena calidad espermática Fernández, Díaz, & Muñoz (2007), en nuestro proyecto de los 507 ovocitos provenientes de ovarios de matadero seleccionados y ya madurados in vitro son fertilizados y dando como resultado 396 posibles cigotos fecundados con un tasa de fertilización del 78,1%, en cambio de los 190 ovocitos de reproductoras girolando, que se selecciona para maduración y fertilizar, 87 posibles cigotos son fecundados con una tasa de fertilización del 79,8%. Dándonos un mayor porcentaje de fecundación a comparación de Arav (2001), que reporta una tasa de fertilización del 52%.

Como resultado la investigación se encontró un promedio del 78% de ovocitos fecundados, queriendo decir que independientemente de las técnicas de aspiración folicular esta variable no se ve afectada, encontrándose en similar tasa de fertilización de Fernández,

Díaz, & Muñoz (2007), 73,3% de 544 ovocitos que seleccionaron, logrando fertilizar 399 ovocitos, de la misma manera Arav (2001), señala la necesidad de obtener mayor número de ovocitos recolectados, ya que esta incrementaría la probabilidad de fecundación.

Los resultados obtenidos por la variable de clivaje, el estadio y la calidad de los cigotos viables provenientes de reproductoras Girolando fue de 27,5% siendo este mayor al obtenido por los ovarios de matadero 10,4%, dicha fluctuación de valores puede estar influenciada por la morfología de los ovocitos recolectados ya que estos deben presentar citoplasma homogéneo con granulaciones finas, de coloración marrón y completamente envueltos por varias capas de células del cúmulo dispuestas en forma compacta (Keisher, 2004),

Asimismo, el tamaño del folículo mediano y grande tiene un efecto negativo en la competencia de desarrollo de los ovocitos de bovino in vitro cuando está presente un CL en el ovario Karami, Shahsavari, Hajarian, & Moghaddam, (2015), corroborando con lo mencionado por los otros autores Lim, y otros, (2007), menciona que el factor de crecimiento epidermal (EGF), mejora la maduración nuclear y la tasa de clivaje, así como el desarrollo embrionario.

CAPITULO VI

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

Con respecto a la variable clasificación de calidad de ovocitos

El número total de ovocitos rescatados, en ovarios de matadero con 300 ovarios es de 708 ovocitos y con ovarios de 15 reproductoras girolando es de 190 ovocitos, donde la técnica OPU y técnica de Aspiración folicular, presentan igualdad de rescate en ovocitos de calidad A (excelentes) con 25,8%, y 25,7%, con la diferencia que la técnica de aspiración folicular se llega a obtener mayor número de ovocitos rescatados, por qué se logra posicionar, visualizar y apreciar mejor los folículos entre dos y seis milímetros para la punción.

El mayor porcentaje de ovocitos en calidad C (Malos), presenta la técnica OPU con 42,1% a diferencia de Aspiración folicular con 28,4%, esto se da porque existe diferencia con la medida de agujas que se trabaja para la punción, además que el operario se enfrenta obstáculos, como la presión negativa generada por el bovino al ingresar la sonda transvaginal dificultando posicionar el ovario para visualizar los ovocitos en el ecógrafo.

No obstante, se logró una mayor recolección de ovocitos en ovarios de matadero, la técnica de recuperación ovocitaria OPU es repetible, además que permite reconocer el origen de los ovocitos, lo que no se puede hacer con los ovarios de matadero.

Con respecto a la Tasa de fecundación de los ovocitos

Los ovocitos fecundados independientemente de su procedencia, ovarios de matadero y reproductoras Girolando y de su técnica de aspiración folicular, tienen similar tasa de fecundación sin diferencia significativa con 78,1 y 79,8%, es decir que la fecundación es controlada por su maduración in vitro de ovocitos y capacitación espermática que tenga el semen utilizado.

Con respecto al Clivaje

Los resultados demuestran que el clivaje no depende de la técnica que se emplee en la recuperación de ovocitos, ya que existe una relación directa entre el desarrollo del ovocito y

el número de capas de cúmulos que lo rodean, lo que permite que estos conserven su capacidad de progreso normal.

Recomendaciones

Se recomienda que para OPU en reproductoras, realizar una estimulación y regulación hormonal para tener iguales crecimientos de folículos además de una suplementación alimenticia y de sales minerales con tres meses de anticipación para punzar.

Calibrar la bomba al vacío y la guía con una presión adecuada para evitar que los ovocitos presenten pérdida de cúmulos, además de utilizar agujas 20G para vacas y 18G para vaconas en la técnica OPU.

Se recomienda que los medio SOF, TALP.H y maduración se encuentren en los pH requeridos para tener un correcto desarrollo en la incubadora.

Se recomienda que los ovarios de matadero no excedan de las tres horas de transporte a temperatura controlada 37,5 – 37,8°C después de haberse faenado, para evitar cristalización en el líquido folicular.

CAPITULO VII

Bibliografía

- Aller, J., Alberio, R., & Palma, G. (28 de 03 de 2000). *Scielo*. Obtenido de Gestation with in vitro produced embryos from oocytes: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2000000100004
- Alvarado, A., Gamarra, G., Gallegos, A., & Samillán, S. (2016). OOCYTES RECOVERY RATE IN CULL HOLSTEIN COWS. *Dialnet*, 63-68.
- Alvarado, J. (2017). *Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero*. Cuenca- Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Arav, A. (2001). *Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter*. *Theriogenology*.
- Baruselli, S., Sá Filho, M., Ferreira, R., Ventas, S., Gimenes, L., Vieira, L., . . . Bó, G. (2012). Manipulación del desarrollo del folículo para asegurar una calidad óptima de los ovocitos y tasas de concepción en el ganado. *Reprod Domest Anim*, 134-141.
- Bellenda, O. (2003). *LA ECOGRAFÍA APLICADA A LA REPRODUCCIÓN EN ESPECIES DE INTERÉS PRODUCTIVO*. Produccion-animal. Obtenido de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/11-ecografia_aplicada.pdf
- Bó, G., Baruselli, P., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., . . . Mapletoft, R. (2002). El control de desarrollo onda folicular para auto- nombrado Los programas de. *Theriogenology*, 53- 72.
- Bols, P. (1997). *Transvaginal Ovum Pick-Up in the cow: Technical and Biological Modifications*. Ghent - Belgium. : University of Ghent.
- Bols, P. (2005). Puncture of mature ovarian follicles in bovine assisted reproduction. *Real Academia de Medicina de Bélgica*, 177-202.

- Byskov, A. (1982). Primordial germ cells and regulation of meiosis. En *En reproduction in mammals* (págs. 1-16). Cambridge university.
- Chamba, H., & Ortega, M. (2016). *Comparación de dos métodos de recolección (slicing y aspiración folicular) de ovocitos bovinos obtenidos post mortem para la producción de embriones in vitro*. Loja-Ecuador: Universidad Nacional de Loja. Obtenido de <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/9892>
- Collantes, J. (2011). *TIEMPO DE VIABILIDAD DE LOS OVOCITOS BOVINOS RECUPERADOS EN EL CAMAL DE SANTA CRUZ – GALÁPAGOS, EN CONDICIONES SIMILARES A LA DE NUESTRAS HACIENDAS*. GUAYAQUIL – ECUADOR: UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL.
- Corredor, E., & Páez, E. (2012). Aplicaciones de la ultrasonografía en la reproducción bovina. *Ciencia y Agricultura*, 29-37.
- Cutini, A., Teruel, M., & Cabodevilla, J. (2000). *FACTORES QUE DETERMINAN EL RESULTADO DE LA TRANSFERENCIA NO QUIRÚRGICA DE EMBRIONES BOVINOS*. Sitio Argentino de Producción Animal .
- Delgado, R. (2017). *MADURACIÓN in vitro DE OVOCITOS EN METAFASE II DE VACAS POST MORTEM A TRÁVES DE LA TÉCNICA DE FIJACIÓN*. Lima-Peru: UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA.
- Denis, R. (2008). *ASPIRACIÓN FOLICULAR IN VIVO (OPU) UNA NUEVA PERSPECTIVA EN EL CAMPO DE LAS BIOTECNOLOGÍAS DE LA REPRODUCCIÓN*. Cotorro - La Habana: Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (CIMAGT). Obtenido de [http://www.actaf.co.cu/revistas/Revista%20CIMAGT/Rev.Vol.2%20No.2%202008/Vol.2\(2\)08Denis.pdf](http://www.actaf.co.cu/revistas/Revista%20CIMAGT/Rev.Vol.2%20No.2%202008/Vol.2(2)08Denis.pdf)
- Evans, A., Mossa, F., Walsh, S., Scheetz, D., Jimenez, F., Irlanda, J., . . . Irlanda, J. (2012). *"Effects of Maternal Environment During Gestation on Ovarian Folliculogenesis and Consequences for Fertility in Bovine Offspring."*. Dublin - Irlanda: Vol 47.

Fernández, A., Díaz, T., & Muñoz, G. (2007). *In vitro Production of Bovine Embryos*. Caracas - Venezuela: Universidad Central de Venezuela.

Gomez, L. (2006). *APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGIA DE LA ASPIRACION FOLICULAR (OPU) Y FECUNDACION IN VITRO (FIV) COMO HERRAMIENTA PARA UN MEJOR APROVECHAMIENTO DE LAS HEMBRAS CEBUINAS DENTRO DEL PLAN DE MODERNIZACION DEL HATO GANADERO COLOMBIANO*. UNIVERSIDAD DE LA SALLE. Obtenido de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6669/00797729.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Gondos, B. (1978). Oogonia and oocytes in mammals . En *the vertebrata ovary* (págs. 83-120). New York plenum press.

Gonella, A., Atuesta, J., Bernal, S., & Chacon, L. (2013). Generalidades de la produccion de embriones bovinos in vitro. *Investigacion Agraria y Ambiental*, 65-80.

González, V. (2012). *EVALUACIÓN DE LA EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO EN LA MADURACIÓN IN VITRO DE TRES TIPOS MORFOLÓGICOS DE OOCITOS PROCEDENTES DE OVARIOS DE VACAS DE MATADERO DE LA CIUDAD DE LOJA CON DOS MEDIOS DE MADURACIÓN*. Loja- Ecuador: Universidad nacional de Loja. Obtenido de http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5394/1/Tesis%20E2%80%9CEVALUACION%20DE%20LA%20EXPANSION%20DE%20LAS%20CELULAS.pdf?fbclid=IwAR1hgpV6Bzk5qwEKDOC8pP_MB-nocHXWIT69iZvzpP2eX3zX1gimHs4AxI4

Gordon, L. (2003). *Producción de laboratorio de embriones bovinos*. Irlanda: Segunda edicion. Obtenido de https://www.academia.edu/12807876/Laboratory_Production_of_Cattle_Embryo_2nd_Edition_Gordon_I_R

- Hansen, P., Drost, M., Rivera, R., Paula-Lopes, F., Al-Katanani, Y., & Krininger, C. C. (2001). Impacto adverso del estrés por calor en la producción de embriones: causas y estrategias de mitigación. *ELSEVIER*, 91-103. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X00004489>
- Hashimoto, S., Takakura, R., Kishi, M., Sudo, T., Minami, N., & Yamada, M. (1999). Ultrasound-guided follicular aspiration: collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of live or slaughtered cows. *ELSEVIER*, 51(4), 757-765.
- Hawk, H., & Pared, J. (1994). Rendimiento mejorado de blastocistos bovinos a partir de ovocitos producidos in vitro. I. Selección de ovocitos y cigotos. *Teriogenología*, 1571-1583.
- Hernandez, A. (2006). Fisiología de los animales. En *Médica Panamericana Madrid-España*. España-Madrid: Segunda edición.
- INTA. (2010). *Memoria técnica curso de graduación: Producción in vitro y criopreservación de embriones bovinos*. Balcarce - Argentina.
- Janke, M., West, J., & Youngs, C. (2015). *Evaluation of in vivo-derived bovine embryos*. Colorado-E.E.U.U.: Bovine reproduction 1ra edición.
- Karami, S., Shahsavari, M., Hajarian, H., & Moghaddam, G. (2015). Competencia de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos: efecto del cuerpo lúteo y tamaño del folículo. *Iran J Reprod Med*, 615-622.
- Keisher, R. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 14-23.
- Lim, K., Jang, G., Hee Ko, K., Lee, W., Hee Jung, P., Kim, J., . . . Kang, S. (2007). Mejor desarrollo de embriones bovinos in vitro y mayor eficiencia en la producción de terneros viables utilizando medios definidos. *Teriogenología*, 293-302.
- Machatková, M. (1996). *Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle*. *Theriogenology*.

- Manik, R., & Palta, S. (2003). Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. *Animal Reproduction Science*, 155-161.
- Mocha, A., & Quezada, A. (2017). *EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS*. CUENCA-ECUADOR: UNIVERSIDAD DE CUENCA.
- Moussa, M., Shu, J., Zhang, X., & Zeng, F. (2015). *Control materno de la calidad de los ovocitos en el ganado "una revisión"*. ELSEVIER. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432015000238?via%3Dihub>
- Ordoñez, L. (Mayo de 2005). *Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD Bogota; D.C. Colombia. Bogota Colombia*. Obtenido de Modulo De Reproduccion Animal Basica: <https://es.scribd.com/doc/23408590/Manual-de-reproduccion-animal>
- Ortega, M. (2016). *COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RECOLECCIÓN (SLICING Y ASPIRACIÓN FOLICULAR) DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS POST MORTEM PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO*". LOJA- ECUADOR: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.
- Palma, G. (2013). *Biología de la reproducción*. Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Paredes, J. (2015). *EVALUACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA OBTENCIÓN DE OVOCITOS (ASPIRACIÓN FOLICULAR, SLICING, EXPOSICIÓN FOLICULAR) CON DOS CRIOPROTECTORES (ETILENGLICOL Y POLIETILENGLICOL) EN CONEJAS (ORYCTOLAGUS CUNICULUS) DE MATADERO EN EL CEASA*. Cotopaxi - Ecuador: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI. Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2789/1/T-UTC-00325.pdf>
- Pelaez, V. (2011). *PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS*. CUENCA - ECUADOR: UNIVERSIDAD DE CUENCA.

- Prendes, J., Prieto, L., Monforte, C., Fernández, N., Díaz, E., Menéndez, J., . . . Fernández, I. (2002).
Primeros terneros producidos in vitro tras punción ecoguiada de folículos ováricos. *Dialnet*, 411-422.
- Ramírez, O., & Jiménez, C. (2015). *Recolección de Oocitos para Procedimientos in Vitro en Bovinos*. MV Universidad Nacional.
- Roca, T., Hill, W., Viudes de Castro, M., & Vicente, J. (2009). Inseminación Artificial en conejos. *Revista Freagas*, 28-35.
- Snijders, S., Dillon, P., Callaghan, D., & Boland, M. (2000). Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cow. En *Theriogenology* (págs. 981- 989). Ireland.
- Zuckerman, S. (1962). *The ovary*. New York: Vol 1.