



## **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES  
RENOVABLES**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RECOLECCIÓN (SLICING  
Y ASPIRACIÓN FOLICULAR) DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS  
POST MORTEM PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO”**

*Tesis previa a la obtención del  
Título de Médica Veterinaria  
Zootecnista*

**AUTORA:**

María Del Cisne Ortega Erreis

**DIRECTOR**

Dr. Hermógenes René Chamba Ochoa Mg.Sc.

**LOJA – ECUADOR  
2016**

## CERTIFICACIÓN

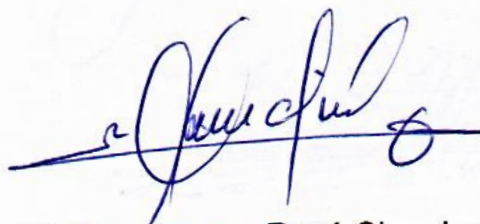
Dr. Hermógenes René Chamba Mg.Sc.

**DIRECTOR DE TESIS**

### CERTIFICA:

Haber revisado el trabajo de tesis titulado: **“COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RECOLECCIÓN (SLICING Y ASPIRACIÓN FOLICULAR) DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS POST MORTEM PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO.”**, realizado por la Srta. Egresada **MARIA DEL CISNE ORTEGA ERREIS**, previo a la obtención del título de **MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**; el mismo que se desarrolló dentro del cronograma establecido. Por lo consiguiente se autoriza para que prosiga con los trámites correspondientes a la tesis.

Loja, Enero del 2015



Dr. Hermógenes René Chamba

**DIRECTOR**

**“COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RECOLECCIÓN (SLICING Y ASPIRACIÓN FOLICULAR) DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS POST MORTEM PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO”**

Tesis presentada al Tribunal de Grado como requisito previo a la obtención del título de **Médica Veterinaria Zootecnista**, en el Área Agropecuaria y de recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja.

**APROBADA:**

  
Dr. Luis Antonio Aguirre Mendoza. Mg. Sc  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

  
Dr. Tito Ramiro Muñoz Guarnizo Mg. Sc.  
**VOCAL DEL TRIBUNAL**

  
Dr. Vladimir Efrén Rodríguez Bravo Mst.  
**VOCAL DEL TRIBUNAL**

## AUTORIA

Yo, **MARÍA DEL CISNE ORTEGA ERREIS** declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

**Autora: María del Cisne Ortega Erreis**

**Firma:** 

**Cédula:** 110515806-5

**Fecha:** 01 de Abril de 2016


## CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, MARIA DEL CISNE ORTEGA ERREIS declaro ser autora, de la tesis titulada "COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RECOLECCIÓN (SLICING Y ASPIRACIÓN FOLICULAR) DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS POST MORTEM PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO", como requisito para optar al grado de: Médica Veterinaria Zootecnista, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 01 días del mes de Abril de dos mil dieciséis

**Firma:**   
**Autora:** Maria del Cisne Ortega Erreis  
**Número de cédula:** 1105158065

**Dirección:** Las Pitas  
Sector: Nueva Granada  
Calles: Arturo Bailón y Colón

**Correo electrónico:**  
mcisne2@gmail.com

**Teléfono:** 07-61-6251

**Celular:** 0995676413

### DATOS COMPLEMENTARIOS:

**Director de Tesis:** Dr. Hermógenes René Chamba  
**Tribunal de Grado:**

**Presidente del Tribunal:** Luis A. Aguirre M. Mg.Sc  
**Vocal:** Dr. Tito Muñoz Guarnizo Mg. Sc  
**Vocal:** Dr. Vladimir Rodríguez B. Mg. Sc

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar a Dios por haberme guiado por el camino de la felicidad hasta ahora; en segundo lugar a cada uno de los que son parte de mi familia; por siempre haberme dado su fuerza y apoyo incondicional que me han ayudado y llevado hasta donde estoy ahora.

Al Dr. Hermogenes Chamba director de este trabajo por todas las facilidades y apoyo brindado en la realización de este proyecto de tesis. Al laboratorio de Reproducción Animal por permitirme la utilización de los implementos disponibles, indispensables para el desarrollo del mismo.

A mis profesores a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su experiencia y enseñanza y finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa Universidad Nacional de Loja la cual abre sus puertas a jóvenes como yo, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

*La Autora*

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios, a mis padres, hermanos, a mi abuelita y a todas esas personas que desde el cielo han estado cuidándome y dándome fortaleza para continuar. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento de mi inteligencia y capacidad.

*Con cariño*

# ÍNDICE GENERAL

CERTIFICACIÓN.....	ii
APROBACIÓN.....	iii
AUTORIA.....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE GENERAL .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
TITULO.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1. EVOLUCIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA.....	3
2.2. DESCRIPCIÓN BREVE DE LA ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL LOS GENITALES DE LA HEMBRA.....	4
2.2.1. Gametogénesis.....	9
2.3. FISIOLOGÍA DEL CICLO SEXUAL.....	15
2.3.1. Ciclo Estral.....	19
2.3.2. Hormonas Ováricas .....	22
2.4. MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA OBTENCIÓN DE OVOCITOS .....	23
2.4.1. Método de Slicing.....	25
2.4.2. Método de aspiración.....	25
2.4.3. Clasificación de ovocitos .....	26
2.5. ASPECTOS GENERALES QUE AFECTAN LA REPRODUCCIÓN .....	28
2.6. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO.....	30
2.6.1. Sistemas de producción in vitro de embriones .....	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.1. MATERIALES.....	36
3.1.1. De laboratorio .....	36
3.1.2. De oficina.....	36



3.2.	MÉTODOS .....	37
3.2.1.	Ubicación .....	37
3.2.2.	Unidades experimentales.....	37
3.2.3.	Recolección de ovocitos.....	38
a.	Método de aspiración folicular .....	38
b.	Método de Slicing.....	38
3.2.4.	Clasificación de ovocitos .....	38
3.3.	VARIABLES EN ESTUDIO .....	39
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	40
4.	RESULTADOS .....	42
4.1.	TAMAÑO DE LOS OVARIOS OBTENIDOS .....	42
4.3.	NÚMERO DE OVOCITOS.....	44
4.4.	CALIDAD DE OVOCITOS .....	44
5.	DISCUSIÓN.....	45
6.	CONCLUSIONES .....	47
7.	RECOMENDACIONES.....	49
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	50
9.	ANEXOS .....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tamaño de los ovarios obtenidos en el Camal Frigorífico de Loja .....	42
<b>Tabla 2.</b> Calidad en función del tamaño de la muestra. ....	43
<b>Tabla 3.</b> Número de ovocitos recuperados con los métodos de estudio .....	44
<b>Tabla 4.</b> Número de ovocitos de calidad obtenidos en los métodos propuestos. ....	45
<b>Tabla 5. Análisis estadístico</b> .....	56
<b>Tabla 6.</b> Frecuencias de los métodos aplicados .....	57
<b>Tabla 7.</b> Frecuencias del tamaño de los ovarios.....	57
<b>Tabla 8.</b> Frecuencias de la calidad de los ovocitos recuperados. ....	57
<b>Tabla 9.</b> Cruzada.....	59
<b>Tabla 10.</b> Pruebas de chi-cuadrado.....	59
<b>Tabla 11. Cruzada</b> .....	59
<b>Tabla 12.</b> Pruebas de chi-cuadrado.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Ubicación Geográfica</b> .....	37
<b>Figura 2.</b> Porcentaje del tamaño de las muestras.....	42
<b>Figura 3.</b> Calidad en función del tamaño de la muestra.....	43
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de ovocitos que se obtuvo a través de los métodos de aspiración folicular y Slicing.....	44
<b>Figura 5.</b> Calidad de ovocitos recuperados.....	45
<b>Figura 6.</b> Variables.....	55
<b>Figura 7.</b> Se dio valores a cada dato.....	56
<b>Figura 8.</b> Tabla de frecuencia.....	56
<b>Figura 9.</b> Prueba de chi cuadrado calidad – Método.....	58
<b>Figura 10.</b> Prueba de chi cuadrado calidad – Tamaño.....	58
<b>Figura 11.</b> Resumen de contrastes de hipótesis.....	60

**“COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RECOLECCIÓN (SLICING Y  
ASPIRACIÓN FOLICULAR) DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS  
POST MORTEM PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO”**

## RESUMEN

Para el presente trabajo de investigación se ejecutó con el propósito de Evaluar la calidad, cantidad y rendimiento de los ovocitos obtenidos post mortem mediante los métodos de aspiración folicular y Slicing. El trabajo de campo se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional de Loja durante los meses de abril a julio del año 2015, se efectuó el procesamiento de 200 ovarios procedentes del Camal Municipal. Las muestras se evaluaron por las técnicas de aspiración folicular y Slicing del ovario. La técnica empleada de Slicing del ovario tuvo mejores resultados en comparación con la técnica de aspiración folicular en cuanto a cantidad de ovocitos recuperados con 55.49%; en cuanto a calidad la técnica que recupero más ovocitos aptos para la producción de embriones in vitro fue la de aspiración folicular con el 46.4%.

**Palabra clave:** Métodos, recolección, ovocitos.

## ABSTRACT

This research work was carried out in order to evaluate the quality, extent and productivity of oocytes which were obtained post mortem through follicular aspiration and Slicing method. Fieldwork was conducted at the Animal Reproduction Laboratory located at Universidad Nacional de Loja from April to July 2015. A total of 200 ovaries samples obtained at the Municipal Slaughterhouse were processed. The sampling was evaluated throughout the follicular aspiration and ovarian slicing techniques. The ovarian Slicing technique had better results compared to the follicular aspiration procedure, with a 55.49% of retrieved oocytes; regarding quality, the follicular aspiration technique obtained more oocytes suitable to produce in vitro embryos with a 46.4%.

**Keywords:** Methods, harvesting, oocytes

# 1. INTRODUCCIÓN

La importancia de los métodos de recolección de ovocitos es maximizar el número total de estos e incrementar su calidad (citoplasma homogéneo y varias capas compactas de células del cúmulus) tras ser recuperados de los ovarios, para que luego puedan ser sometidos a maduración, fecundación y cultivo in vitro.

Los ovarios contienen un elevado número de folículos que se encuentran en diferentes estados de desarrollo (primordiales, en crecimiento, atrésicos), de los cuales solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se tornarían en folículos atrésicos.

Se deben evaluar los factores externos que están involucrados en la manipulación de los ovocitos antes de realizar el cultivo in vitro, ya que pueden afectar la capacidad de los ovocitos para lograr un buen desarrollo, reflejado en una adecuada fertilización y división embrionaria. Dentro de estos factores externos que están relacionados con la manipulación de los ovarios, se encuentran la temperatura de almacenamiento de los ovarios y el tiempo de recolección de los ovocitos después del sacrificio.

La temperatura a la cual se deben transportar los ovarios desde el rastro hasta el laboratorio oscila entre 35 y 37 °C. Temperaturas inferiores a los 30 °C durante el almacenamiento de los ovarios producen pérdida de los productos de transcripción y lesión de los organelos a nivel citoplasmático, los cuales van a ser mediadores importantes del desarrollo embrionario temprano. El tiempo de recolección de los ovocitos de los ovarios igualmente influye en la competencia de desarrollo. Reportan que los ovarios pueden permanecer en solución salina a temperatura de 30 a 37 °C durante 8 h sin afectar la calidad de los ovocitos para los procesos de maduración y fertilización in vitro.

Para la producción in vitro de embriones, la eficiencia del método de recolección y la clasificación de los ovocitos, son un prerrequisito.

En el campo científico y experimental es importante contar con ovocitos de buena calidad, ya que son una excelente fuente de material biológico útil en el desarrollo de nuevas técnicas encaminadas para la reproducción asistida, como la fertilización in vitro (Diez, et al, 2005).

Actualmente en el Ecuador se conoce muy poco sobre estas biotecnologías ampliamente utilizadas en países como Brasil, Colombia, Estados Unidos, Canadá, y muchos otros que no solo utilizan esto como una herramienta para mejorar la genética de sus rebaños, sino que se ha tornado en un negocio muy lucrativo por el potencial de producir animales genéticamente superiores en cantidades que, de forma natural o con la inseminación artificial, sería imposible obtener.

Para la ejecución del presente trabajo de investigación, se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar la calidad de los ovocitos para diferenciar sus estadios en cada método propuesto.
- Evaluar la cantidad de ovocitos obtenidos en cada método.
- Determinar el método que mejores resultados proporciona.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. EVOLUCIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA**

La Biotecnología reproductiva en animales domésticos consiste en la utilización de varias biotécnicas, con el fin de mejorar la eficiencia de la reproducción natural mediante la masificación de la genética de alta calidad y disminución de los intervalos generacionales. Su importancia reside en que ha permitido que se aumenten los niveles productivos con todos los beneficios que esto trae.

Las Técnicas En Biotecnología Reproductiva constituyen el grupo de procedimientos más representativos de la Biología y su control por parte del hombre. Contemplan la manipulación de las células germinales reproductivas, el manejo reproductivo y la conservación de los seres vivos.

Cada técnica desempeña por sí misma un papel importante y ha sido la base para el avance y desarrollo de otros procedimientos más complejos, partiendo de la investigación y su aplicabilidad en la Industria Animal y la Medicina Humana.

Algunas han sido aplicadas y difundidas de manera amplia, con resultados satisfactorios. Sin embargo, otros no lo han sido tanto debido a su complejidad y altos costos de implementación, por lo que están aún en el campo de la investigación.

Los nuevos conocimientos adquiridos sobre la dinámica folicular, mediante el empleo de la ecografía y la utilización de hormonas para la manipulación del ciclo estral, son herramientas que permiten implementar de forma práctica la utilización de estas biotecnologías por parte de los ganaderos.

A manera de ejemplo, la utilización de protocolos que combinan la aplicación de hormonas para sincronizar el celo y la ovulación, ha permitido inseminar



un grupo significativo de hembras sin detección del celo y preñar más de la mitad de ellas en un solo día de trabajo. La otra mitad se la puede servir con toro. Este método tiene no solo un impacto en el mejoramiento genético, sino también en el aspecto económico, al tener un costo por preñez por IA compatible con los costos de preñez por toro. Por lo tanto la biotecnología aplicada debe mejorar la calidad del producto obtenido, aumentando su valor en el mercado (Tribulo , 2008).

## **2.2. DESCRIPCIÓN BREVE DE LA ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL LOS GENITALES DE LA HEMBRA**

El aparato reproductivo de la vaca es muy complejo; no solo produce el óvulo o célula sexual femenina, sino que también facilita el crecimiento y alimentación del feto en desarrollo, para luego, durante el parto expulsar el feto completamente desarrollado. Los órganos reproductores femeninos, como los del macho, están controlados por un complicado sistema endocrino.

Es esencial el conocimiento de la anatomía de los órganos reproductores de la vaca para conducir con éxito un programa de reproducción bovina, especialmente cuando se trabaja con la inseminación artificial. Estos órganos son los siguientes: Ovarios, oviductos o trompas de Falopio, útero (cuerpo, cuernos y cuello o cérvix), vagina, vulva y clítoris.

El óvulo es expulsado del ovario, el cual es recibido por la fimbria del oviducto y a su paso por éste, es donde normalmente ocurre la fecundación para llegar luego al cuerno uterino donde se anida y se produce el desarrollo del feto hasta el momento del parto (Yanguma, 2009).

✓ **La vulva:**

Es la porción anatómica más externa del aparato genital femenino. La unión de la vagina y la vulva está marcada por el orificio uretral externo.

La hendidura vulvar, posee dos labios gruesos y corrugados que se unen en dos comisuras, superior e inferior. El orificio uretral externo (abertura que permite la salida de la orina procedente de la vejiga), se halla 10 o 12 centímetros por delante de la comisura inferior. Debajo y detrás de este orificio existe un saco ciego, el divertículo sub uretral que mide cerca de 3.5 cm. de profundidad (el inseminador debe evitar introducir el catéter en este orificio).

La vulva constituye entonces la abertura exterior del tracto reproductor de la vaca; se comunica con la vagina por medio del vestíbulo. La vulva aumenta de tamaño y varía su coloración en las épocas de celo. Cerca de la abertura externa y en la parte exterior, se encuentra un órgano sexual llamado clítoris, cuya estimulación excita sexualmente a la hembra.

✓ **Vagina:**

Está ubicada horizontalmente y paralela al recto, por encima de la vejiga. El tamaño de la vagina es aproximadamente de 25 centímetros y varía de una vaca a otra, dependiendo de la raza, el desarrollo corporal y el estado reproductivo de la hembra. Las paredes de la vagina son elásticas y segregan una sustancia lubricante durante el parto y en los períodos de celo o calor.

La vagina está localizada dentro de la cavidad pélvica, entre la vulva y el cuello del útero. La vagina sirve como saco de aceptación del pene del macho durante la cópula o monta.

✓ **Cuello del útero o cérvix:**

Con unas 4 a 5 pulgadas de largo y unas 2 pulgadas de ancho, el cérvix es de suma importancia en la reproducción bovina. En general el cérvix es una

rápida disminución del tamaño del tracto reproductor que sirve de protección del útero a la entrada externa de contaminantes que de otra manera fácilmente entrarían desde la vagina. Durante la preñez la cervix crea un tapón natural (tapón cervical) para crear un medio estéril y seguro en el que vivirá el feto. La ruptura de este tapón durante la preñez que algunas veces puede suceder durante una inseminación errónea, (de una vaca preñada) puede provocar un aborto. La luz (lumen) del cervix es muy angosto y contiene una serie de pliegues de la mucosa que forma 3 o 4 anillos internos inclinados en dirección caudal. Hay algunas ramificaciones de estos principales o secundarios anillos que ayudan al transporte y reservorios del semen. Este gran número de anillos a su vez ayuda al cervix a expandirse durante el parto. Además el cervix produce unas secreciones gruesas durante el metaestro, diestros y la preñez y unas secreciones delgadas que son abundantes durante el celo que ayudan a facilitar el transporte y la lubricación del semen (Rivera, 2009).

✓ **Útero:**

Es un órgano cavitario de paredes gruesas en el cual se implanta el embrión y se desarrolla el feto. El útero de las hembras de los animales domésticos es de tipo bicorneo, en el cual se diferencia el cuello o cervix, el cuerpo y los cuernos. La pared uterina se compone de tres capas: la mucosa o endometrio uterino, la muscular o miometrio y la serosa o perimetrio.

La membrana mucosa del cuello uterino está cubierta de epitelio cilíndrico mono-estratificado, versátil, en el cual se hallan células basales secretoras. En esta sección la mucosa forma pliegues longitudinales y transversales. Los pliegues transversales dirigen sus vértices hacia la vagina (Akátov, Konov, Paspelov, & Smirnov, 1977).

Las carúnculas durante la preñez aumentan su tamaño, se entrelazan con otras estructuras semejantes que se desarrollan en la placenta fetal o sea los cotiledones, a través de los cuales se alimenta el ser que comienza a formarse. A medida que aumenta el período de gestación, aproximadamente 282 días, el útero aumenta considerablemente de tamaño hasta dar cabida a un ternero, que puede llegar a pesar hasta 40 kilogramos al momento del

nacimiento según la raza; además aproximadamente 20 litros de líquido amniótico y una placenta que puede pesar 5 kilogramos (Vatti, 1993).

✓ **Oviductos o trompas de Falopio:**

Cada oviducto (derecho e izquierdo) se convierte en la estructura que une los cuernos uterinos con el ovario, además de ser el sitio donde se lleva a cabo la fertilización. El extremo craneal del oviducto presenta una abertura ancha y delgada en forma de embudo llamada fimbria la cual abraza el ovario y captura el óvulo durante la ovulación. Una vez que el óvulo entra el oviducto, viaja y se deposita en la ampolla (la parte media del oviducto) esperando por el espermatozoide para llevar a cabo la fertilización. Si la fertilización ocurre el ovulo fertilizado (embrión) viaja en dirección caudal a través del istmo y la unión uterotubal para llegar al cuerno 3 a 4 días después.

✓ **Los ovarios:**

Los ovarios son las estructuras más importantes y complejas del tracto reproductor de las vacas debido a que interactúa con otras glándulas y estructuras nerviosas en el cuerpo para poder controlar el ciclo reproductivo de la vaca. El complejo ovario-hipotálamo-hipófisis se encarga de gobernar las funciones ováricas y uterinas que determinan los diferentes eventos del ciclo estral (celo y gestación).

El óvulo de la vaca, es fecundado normalmente por un sólo espermatozoide e inmediatamente comienza el crecimiento por una serie de divisiones. La célula individual fecundada, se divide para formar dos, luego cuatro, ocho, etc. Las partes anatómicas que componen el ovario son las siguientes: epitelio germinal, túnica albugínea, folículo primario, folículo maduro, cuerpo hemorrágico, cuerpo lúteo, cuerpo albicans, folículo atrésicos e hilio (Rivera, 2009).

Los ovarios están localizados en la parte superior de la cavidad abdominal

más o menos a una distancia de 30 a 45 centímetros del orificio vulvar. Cada ovario mide aproximadamente de 3 a 4 centímetros de largo por 2 a 3 de ancho. Este tamaño varía según el estado reproductivo del animal, tamaño y raza de la vaca y según la función que desempeñe el ovario en el momento del ciclo estral (folículo, cuerpo amarillo, entre otros).

Además de producir óvulos, el ovario tiene como función primordial la producción de hormonas femeninas: estrógenos y progesterona, las cuales dan a la hembra sus características y comportamiento femenino (Yanguma, 2009).

Las funciones del ovario son dos: la producción de ovocitos y la síntesis y secreción de hormonas (estrógenos y progesterona). La primera función la realiza mediante dos procesos estrechamente ligados entre sí, denominados foliculogénesis y ovogénesis.

Durante el desarrollo fetal y en el proceso de evolución desde gónadas indiferenciadas hasta convertirse en ovario, las células germinales primitivas dan lugar por mitosis sucesivas a las células sexuales u ovogonias, que por aumento de su masa citoplasmática se convierte en ovocitos de primer orden; estos se rodean de una sola capa de células epiteliales constituyendo los folículos primarios. En el momento del nacimiento en la corteza del ovario se encuentran varios miles de estos folículos primarios (junto a su ovocito de primer orden correspondiente), que permanecerán inactivos hasta la pubertad. La mayor parte de estos folículos sufrirán atrofia desde el nacimiento hasta la senilidad reproductiva, acelerándose este proceso a partir de la pubertad.

Cuando llega la pubertad, y por acción de las hormonas en la mayoría de las hembras se producen cíclicamente una serie de cambios en la corteza del ovario que tienen como consecuencia la preparación y liberación de ovocitos (células germinales femeninas) que en caso de unirse a un espermatozoide

podrán dar lugar al huevo o cigoto, que tras el proceso de gestación se convertirá en un feto a término.

En el momento del nacimiento en la corteza del ovario hay miles de folículos primarios rodeando a sus correspondientes ovocitos de primer orden. A partir de la pubertad de forma progresiva y secuencial las células epiteliales periféricas de los folículos primarios se dividen y forman varias capas que rodean el ovocito recibiendo esta estructura el nombre de folículo secundario. Este sigue madurando hasta transformarse en folículo terciario y finalmente en el folículo de Graaf (terciario maduro), que sobresale de la superficie del ovario. Este proceso es llamado foliculogenesis, preside el ciclo estral u ovárico y ocurre bajo la influencia de las hormonas gonadotropinas hipofisarias. (Webb, Gosden , Telfer, & Moor, 1999).

Una vez que el folículo de graaf ha finalizado su maduración y que el ovocito se ha preparado mediante un proceso llamado oogenesis. Esta consiste en la ruptura de la pared del folículo de graaf así como del propio epitelio del ovario y en el desprendimiento del ovocito que irá a parar en el infundíbulo. En los rumiantes y cerdas se libera un ovocito de segundo orden y se da la ovulación.

Dicha ovulación produce una pequeña hemorragia en la pared del ovario instaurándose un coagulo en el folículo roto que recibe el nombre de cuerpo hemorrágico. Después se produce una organización del coagulo aumentado de tamaño y con un citoplasma rico en lipocromos que dan coloración amarillenta por lo que esta estructura recibe el nombre de cuerpo amarillo o cuerpo lúteo. En el caso de que no haya gestación el cuerpo lúteo involuciona unos días antes de la siguiente ovulación y se produce una cicatrización con invasión de tejido conectivo apareciendo una costra blanca sobre la superficie del ovario que se denominan cuerpo blanco.

### **2.2.1. Gametogénesis**

El estudio de la gametogénesis es de suma importancia para entender los procesos de la reproducción de cualquier especie. Durante la formación de las

células sexuales ocurren cambios cuyo conocimiento es indispensable para comprender los procesos de la fertilización y desarrollo embrionario. Una de las características importantes de la gametogénesis, es que casi simultáneamente ocurren divisiones celulares (mitosis) y reducción cromática (meiosis); esto indica que al momento de iniciarse el fenómeno de gametogénesis se parte de una célula madre con un número completo de cromosomas (célula diploide), la cual se dividirá por mitosis y meiosis hasta finalizar con una célula que tiene la mitad de los cromosomas de la especie (célula haploide).

Otra característica interesante es que mientras la hembra en los mamíferos superiores, ya cuenta desde el nacimiento o las primeras etapas de su vida con todas las células sexuales que necesitará en su vida adulta, es decir, los ovocitos sólo necesitan estímulo gonadotrópico para madurar, el macho necesitará llegar a la pubertad para contar con las células sexuales ya que al nacer solamente tiene las células juveniles, gonocitos precursores de las células germinales, células de soporte precursoras de las células de Sertoli y células intersticiales. Al proceso de gametogénesis en la hembra se le conoce como ovogénesis y en el macho como espermatogénesis.

Los gametos poseen una dotación simple de cromosomas es decir haploide ( $n =$  número haploide), mientras que el cigoto tiene la dotación completa (diploide) (Curtis, Barnes, Schnek, & Massarini, 2009) característica de cada especie.

Las hembras poseen la dotación homocigótica XX, los machos la dotación heterocigótica XY.

Por motivos de estudio se describirá solo lo relacionado con la hembra bovina en aspectos de morfología reproductiva.

### ✓ **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. En la hembra, los gonocitos migran hacia las crestas genitales y una vez formada la gónada primitiva se convierten en ovogonias. Estas se multiplican aceleradamente por mitosis. Hacia la mitad de la gestación, los ovarios fetales contienen el mayor número de ovogonias y en el momento del nacimiento una hembra tiene en sus ovarios una determinada cantidad de células germinales, las células ya no podrán aumentar en número.

En la mayoría de los mamíferos, poco antes del nacimiento las ovogonias se transforman en ovocitos primarios e inician la meiosis. Al nacer, la becerrea contiene en sus ovarios aproximadamente 150.000 ovocitos primarios. Al tercer mes de vida este número se ha reducido a 75.000 entre el año y medio y los tres años tiene 21.000 ovocitos y entre los 12 y 14 años de edad solamente 2.500. De manera que la gran mayoría de los ovocitos sufren atresia durante la vida del animal y sólo un número reducido de ellos tendrá oportunidad de crecer hasta formar parte de un folículo de Graaf y llegar a ser ovulados. El crecimiento se caracteriza por el desarrollo de los ovocitos.

Tiene su inicio en el periodo prenatal, el ovogonio es el gameto potencial asociado con el folículo primario. El ovogonio se forma a partir de las células germinativas provenientes del endodermo del saco vitelino, el cual se forma a partir del intestino posterior del embrión.

En la gónada diferenciada fetal empieza la proliferación del ovogonio por divisiones mitóticas dentro del parénquima, pero esta proliferación cesa antes del nacimiento, por lo que los ovarios en el momento del nacimiento contienen un número fijo de óvulos potenciales u ovocitos, que se encuentran en el interior de los folículos (Drew & Noden, 1990).

Durante el periodo prenatal y a continuación en el postnatal, se ha comunicado un patrón cíclico en la maduración del oocito. Sin embargo hasta que la hembra alcance la pubertad, ningún ovocito alcanzara su completa maduración. Los ovocitos que inician el desarrollo antes de la pubertad se vuelven atresicos y se pierden como óvulos potenciales. La maduración de los ovocitos, después de la pubertad, continuara de manera cíclica durante toda la vida reproductiva de la hembra.



Durante cada ciclo estral un grupo de ovocitos iniciara la maduración en tanto que otros permanecen latentes. En la vaca, yegua y borrega por lo general solo un ovocito del grupo que inicio el desarrollo alcanzara la madurez y será liberado, a través de la ovulación, al sistema de conductos para su posible fertilización. Los otros ovocitos se tornan atresicos. En la cerda de 10 a 15 ovocitos pueden alcanzar la madurez y ser ovulados.

El primer paso en la madurez incluye el crecimiento del ovocito. La zona pelúcida, una membrana externa de apariencia gelatinosa se formara alrededor del ovocito.

Después de alcanzar el tamaño final, el ovocito sufre la primera de las dos divisiones meióticas. Los productos de la primera división meiótica son el ovocito secundario y el primer cuerpo polar, el cual queda atrapado entre la membrana vitelina y la zona pelúcida, en el espacio peri vitelino. Con esta división, el número de cromosomas en el ovocito cambia de diploide ( $2n$ ) al lugar de haploide ( $n$ ). El ovocito secundario conserva todo el citoplasma y la mitad del material nuclear (cromosomas) del ovocito primario. La otra mitad del material nuclear es exteriorizado como primer cuerpo polar.

La primera división meiótica se completa un poco antes de la ovulación en la vaca, cerda, borrega, y un poco después de la ovulación en la yegua.

El proceso de la segunda división meiótica comienza inmediatamente después de terminada la primera división, sin embargo, este proceso de división no se completara si no existen espermatozoides en el oviducto que se acercan para la fertilización. Con la fertilización los productos de la segunda división meiótica son el cigoto (huevo fertilizado) y el segundo corpúsculo polar (Curtis, Barnes, Schnek , & Massarini, 2009).

Se debe hacer notar que el verdadero óvulo nunca existe en la vaca, borrega, cerda, o si existe solo será un estado transitorio. El óvulo verdadero constituye el producto de la segunda división de la maduración, cuando esta división se completa antes de la fertilización.

#### ✓ **Gameto femenino**

Llamado óvulo, se origina en los ovarios de las hembras, es mucho más grande que el espermatozoide y su tamaño varía en las diferentes especies, su tamaño en los bovinos alcanza de 130 a 160 micras, de modo que es posible verlo a simple vista con el estereoscopio.

### ✓ **Morfología del ovulo**

En el bovino, el ovocito es una célula grande y esférica. Un ovocito maduro es aquel que se libera en la ovulación; se caracteriza porque muestra el primer cuerpo polar en el espacio peri vitelino y es una célula que se encuentra detenida en la metafase de su división meiótica, o sea, en metafase II (MII).

Es la célula aislada más grande del organismo. La relación superficie/volumen es  $\frac{3}{4}$  del radio, es decir, a mayor radio la relación de la superficie de la membrana celular respecto a su volumen es menor.

Células con mayor volumen contienen más agua y proporcionalmente, menos superficie para que ésta salga y para que entren las sustancias crioprotectoras penetrantes.

Otra característica del ovocito en MII es que los componentes sub celulares son extremadamente sensibles a los cambios de temperatura (Magistrini M., 2009) osmolaridad e iones. En el ovocito en MII, los cromosomas y los microtúbulos del huso están libres en el citoplasma, y las vesículas con los gránulos corticales están localizadas próximas a la membrana plasmática u ovo lema (McWilliams , Gibbons, & Leibo, 1995).

Los ovocitos maduros presentan una gran heterogeneidad en la distribución y organización de los orgánulos citoplasmáticos y en la permeabilidad de la membrana al agua (Fabbri R., 2000). Están rodeados por las células de la corona y más externamente por las células granulosas del cúmulo (Hafez, 2002).

El ovocito inmaduro, con vesícula germinal visible, es decir, en profase I (PI), tiene los cromosomas condensados y localizados dentro del núcleo o vesícula germinal.

Están protegidos por la membrana nuclear a diferencia de los cromosomas del ovocito en MII. En el ovocito inmaduro no se ha formado el huso meiótica. La congelación de ovocitos en PI previene la alteración del huso y la aneuploidía.

### **Estructura detallada del ovulo**

#### **✓ Corona radiada**

Las células de la corona radiada presentes en los óvulos de bovinos, ovinos subsisten unas pocas horas después de la ovulación. Las extensiones de estas células penetran la zona pelúcida y se entretrejen, y poco después de la ovulación desaparecen, esto se da por la exposición de los ovocitos ovulados en fluidos oviductales que contienen enzimas fibrinolíticas las que producen la retracción y degeneración de estas proyecciones, y como resultado de esto se da la desnudación del óvulo.

#### **✓ Zona pelúcida**

Está compuesta por una capa gelosa de mucoproteína ácida de pH 3-5 que alcanza su grueso de 14-25 micras, esta sirve de protección del óvulo sobre la membrana vitelina.

#### **✓ Membrana vitelina**

Cubre el citoplasma y núcleo del ovocito, está cubierta a su vez por la zona pelúcida.

### ✓ **El vitelo, yema**

Representa el citoplasma del óvulo, contiene materiales lipoides, mitocondrias, mucopolisacáridos, el aparato de Golgi y pigmentos. En la vaca, oveja y cabra el óvulo es de color grisáceo, en la yegua y la perra es de color oscuro. Después de la fertilización se encoje y se forma un espacio peri vitelino en la zona pelúcida.

### ✓ **El núcleo**

Contiene uno o más nucléolos, proteínas, fosfolípidos, fosfatasas, ácido desoxirribonucleico (ADN).

## **2.3. FISIOLÓGÍA DEL CICLO SEXUAL**

El Ciclo Sexual, que correspondería a la Dominante Sexual, es un complejo de procesos fisiológicos, morfológicos, bioquímicos y endocrinos que se reproducen siempre siguiendo el mismo orden y que se repiten a intervalos periódicos, según un ritmo característico y definido para cada especie animal (Nalvandov, 1969).

### ✓ **Ciclo ovárico**

Desde el punto de vista de predominio hormonal al ciclo ovárico se lo divide en dos fases: de maduración folicular y fase progesterónica, entre las cuales se intercala la ovulación (Blanco , 2008).

### ✓ **El proceso de la foliculogenesis**

Los folículos primordiales inician su crecimiento y diferenciación en un proceso aparentemente continuo pero irreversible que es conocido como foliculogenesis. Cuando un folículo primordial entra al grupo de crecimiento, este será conducido a uno de dos hechos: la degeneración por atresia (sufrida por el 99% o más) o la ovulación alcanzada por muy pocos. El intervalo

requerido para la activación de un folículo primordial durmiente hasta su ovulación ha sido estimado en 180 días.

Cuando la capa de células de la granulosa se transforma de aplanadas a cuboidales y la teca interna comienza su diferenciación, al folículo en desarrollo se le denomina folículo primario. Su crecimiento al siguiente estadio, que es el de folículo secundario, se completa por la proliferación de las células de la granulosa. Los folículos en estos dos estadios se describen colectivamente como pre anestrales (Palma , 2001).

La formación de la cavidad del folículo que forma el antro líquido es el siguiente estadio en su desarrollo. Los folículos anestrales existen en el ovario bovino con diámetros comprendidos en el rango de 0.1 a 20 mm. Generalmente se acepta que la formación del antro es un evento influenciado por las gonadotrofinas y que la FSH es la principal hormona responsable. La ultrasonografía proporcionó la evidencia definitiva de que esta última fase del desarrollo folicular se producen en forma de ondas a lo largo de todo el ciclo estral.

#### ✓ **Última fase de la foliculogenesis: las ondas foliculares**

Una onda de desarrollo folicular se puede definir como el desarrollo armónico y simultáneo de varios folículos anestrales pequeños, en promedio 24 por onda con un rango de 8 a 41, funcionando a través de estadios integrados de reclutación, selección y dominancia folicular.

El reclutamiento es un proceso por el que, bajo la responsabilidad de la FSH, un conjunto de folículos anestrales tempranos (2-3 mm de diámetro) comienzan a crecer en un medio con suficiente soporte gonadotrópico que les permita progresar a la ovulación. La selección es un proceso por el cual un único folículo evade la atresia y adquiere competencia para alcanzar la ovulación. La dominancia es el medio por el cual el folículo seleccionado inhibe el reclutamiento de una nueva serie de folículos.

El reclutamiento no ha recibido la misma atención investigativa como la dominancia folicular y la ovulación. Grupos, más que folículos aislados, son reclutados y este proceso se relaciona con cambios medibles de la FSH

circulante. Factores intraováricos estimulados por la FSH están involucrados en el proceso de reclutamiento folicular y los IGF (Factores de crecimiento ligados a la insulina) y sus proteínas de enlace (IGFBP) han sido implicados en la amplificación de la acción de la FSH (Fernandez, 2003).

El mecanismo de la dominancia no ha sido totalmente determinado y se hipotetiza que éste está asociado con un efecto inhibitorio parácrino del folículo dominante sobre los folículos subordinados del mismo grupo en desarrollo. Mecanismos de esta suerte no podrían ser involucrados en la vaca u otras especies monoovulares donde el folículo dominante está presente en un ovario y se produce inhibición de los folículos subordinados del ovario contra lateral. Es por consiguiente más aceptado que la dominancia se produce por medio de algún factor que tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotrofinas. Entre los candidatos se encuentra la inhibina, que es producida primariamente por las células de la granulosa y reduce directamente la secreción hipofisaria de FSH. Un segundo candidato, la folistatina, proteína que tiene alta afinidad de unión por la activina, proteína esta última que eleva la secreción de FSH. Por su unión a la activina, la folistatina reduce la secreción de FSH. El desarrollo del folículo dominante hasta las dimensiones pre ovulatorias depende estrictamente de las gonadotrofinas. Los folículos antrales adquieren los receptores para LH en la teca y para FSH en la granulosa. Bajo la influencia de la LH las células de la teca sintetizan andrógenos que cruzan la lámina basal al interior del compartimiento de las células de la granulosa. Bajo la influencia de la FSH, estos andrógenos son aromatizados en estrógenos. El cambio clave que asienta durante el desarrollo de la competencia ovulatoria de un folículo es la adquisición de receptores para LH por las células de la granulosa. En los folículos donde esto se ha realizado, la LH actúa induciendo la síntesis de grandes cantidades de estrógenos en sinergia con la FSH. Este proceso es un auto refuerzo en el que los estrógenos inducen la formación de más receptores de LH y ésta y la FSH producen una nueva secreción de estrógenos. Los folículos bovinos que se vuelven dominantes o estrógeno activos producen mucho más estrógenos que los subordinados y tienen considerablemente mayor número de receptores tanto de LH como de FSH.

Producto de un incremento en el número de receptores de FSH, el folículo dominante puede ser capaz de seguir creciendo aún en un medio con bajas concentraciones plasmáticas de FSH, mientras que los folículos subordinados sucumben con estos bajos niveles (Fernandez, 2003)

#### ✓ **Dehiscencia folicular / ovulación**

En el momento en que el folículo llega a su madurez completa se rompe por una zona vascular conocida como el estigma, situado en la parte más elevada del mismo. El mecanismo exacto de la ruptura del folículo no ha sido establecido definitivamente. Se considera que junto a un aumento de la presión intracavitaria debida a la hipersecreción de líquido folicular, también interviene la acción de fibras musculares lisas del ovario, otros autores hacen responsable de esta dehiscencia a la congestión ovárica y la ruptura de vasos; mientras que algunos indican la acción de un fermento diastático segregado por las células foliculares. Lo que si es cierto es que estos mecanismos complejos histo-fisiológicos muy precisos, que interactúan, son condicionados por un clímax neuro hormonal bien definido, en el cual intervienen las gonadotropinas hipofisarias, especialmente la LH y las hormonas ováricas.

#### ✓ **Fase progesterónica o lutéinicas**

Todo folículo roto se transforma en una glándula endocrina especial denominada cuerpo lúteo, que produce una hormona conocida por progesterona. Inmediatamente después de romperse, el folículo se llena de un coaguló hemorrágico- fibroso; las células de la granulosa que permanecen en su lugar aumentan de volumen y presentan un claro carácter secretorio; estas células forman una capa densa que rápidamente se ve invadida por haces vasculo conjuntivos que nacen en la teca interna. La vítrea, que primeramente se ve rechazada, es pronto atravesada por estos haces, adelgazando progresivamente hasta que termina por desaparecer, al mismo tiempo que se organiza la rica red capilar de la capa progesterónica.

Las células lutéinicas se cargan de grasa fuertemente coloreada, por un pigmento, carotinoide, la luteína, que es la que le da al cuerpo lúteo o amarillo

su coloración característica. Al lado de estas agrupaciones lutéinicas, las células del cuerpo amarillo contiene otro tipo de sustancias, entre las cuales se ha podido identificar la colessterina, fosfáticos, grasa, etc. El cuerpo amarillo, así constituido, tiene una evolución variable según que la ovulación haya sido o no seguida de fecundación.

En el primer caso dará lugar a un cuerpo amarillo de la gestación, cuya duración de su actividad se extiende a lo largo del periodo, más o menos largo, de gestación, que varía según las especies; en el segundo caso, cuando no hay gestación, tiene una vida muy limitada como cuerpo lúteo periódico y se encuentra relacionada con la duración del ciclo estral.

Después de un periodo de permanencia variable, el cuerpo amarillo periódico regresa, involuciona, las células que lo constituyen sufren una degeneración grasa, el tejido conjuntivo aumenta y termina para envolver y ahogar los elementos glandulares, de tal forma que al final, el cuerpo amarillo no constituye otra cosa que pequeños cúmulos conjuntivo- fibrosos amarillentos o blanquecinos denominados “corpora albicantia”, o cuerpos cicatrízales, los cuales no poseen ninguna actividad fisiológica.

Este breve resumen demuestra que en todo ciclo ovárico existen dos fases de duración desigual: la fase folicular, relativamente corta y que desemboca en la ovulación, y la fase lutéinicas o progesterónica, más larga, que corresponde a la evolución del cuerpo amarillo.

Estas modificaciones cíclicas que tiene asiento en el ovario no evolucionan de una manera independiente, sino que están íntimamente relacionados con la actividad hipotálamo - hipofisaria en general, y en particular con la acción de las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH.

### **2.3.1. Ciclo Estral**

El ciclo estral se puede dividir en tres fases:

- **Fase Folicular o de regresión del cuerpo lúteo (Proestro)**



- **Fase Periovulatoria (Estro y Metaestro)**
- **Fase Luteal (Diestro)**

El día 0 del ciclo estral es el día del celo o calor aparente con signos manifiestos y se considera el día del comienzo del nuevo ciclo; sin embargo, y para efectos de mejor entendimiento, la descripción se realizara a partir de la destrucción del cuerpo lúteo del ciclo estral anterior y finalizara con el día de celo del siguiente ciclo.

#### **2.3.1.1. Fase folicular o proestro**

La fase del proestro se inicia con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior o luteolisis y termina con el inicio del estro o celo; dura alrededor de dos o tres días. La destrucción del cuerpo lúteo ocurre gracias a la acción de la PGF2 $\alpha$  de origen uterino. Con la caída de los niveles de progesterona, el efecto de retroalimentación negativa que ejercía a nivel hipotalámico desaparece y comienza a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas FSH y LH las cuales estimulan el crecimiento folicular. Durante el proestro o fase folicular ya existe un folículo dominante que llegara a ser una estructura de  $\frac{3}{4}$  a 1 pulgada de grande y con la aparición de una ampolla llena de líquido folicular y el ovulo que será ovulado. Muchos folículos pueden llegar a desarrollarse durante el proceso de dinámica folicular pero solo 1 (2 o 3 en el caso de gemelos o trillizos) será el folículo dominante seleccionado para ser ovulado. Este folículo dominante se diferencia de los demás en que es estimulado coordinadamente por las hormonas FSH y LH para producir estrógenos. (Lamb, y otros, 2009).

El incremento en los niveles de estrógenos del folículo pre ovulatorio alcanzan los centros nerviosos del hipotálamo que controlan las manifestaciones externas de celo. Aquí se inicia la fase de celo o estro

#### **2.3.1.2. Fase periovulatoria (Estro – Metaestro)**

El estro se define como un periodo de actividad y receptividad sexual en donde el signo principal es que el animal se mantiene en pie y quieto al ser montado por otro. También se observa, entre otros signos, inquietud, inflamación de la vulva, secreción de moco claro y transparente que sale por la vulva (Shearer,

2003): el olor del moco atrae y excita al toro debido a la presencia de feromonas. La duración de celo es muy variable entre grupos de animales variando entre 30 minutos a más de 30 horas (Lucy, 2006), pero se considera que  $16 \pm 4$  horas es el tiempo promedio.

Los signos de estro ocurren gracias a la presencia de los estrógenos provenientes del folículo. En cierto momento los niveles de estrógenos son lo suficientemente altos en concentración y duración como para inducir los síntomas de celo o calor (Sartory M., 2006), así como para incrementar las contracciones del tracto reproductivo facilitando el transporte del espermatozoide y del ovulo; estos altos niveles de estrógenos afectan también a centros endocrinos en el hipotálamo que controlan la liberación de GnRH del hipotálamo y esta a su vez la liberación de FSH y LH de la adeno-hipófisis. El incremento de LH se inicia después de que se hayan iniciado los signos de celo e inicia el proceso de ovulación. (Lucy, 2006)

La LH es generalmente considerada como la gonatropina primaria responsable de la ovulación, sin embargo, la FSH también ha sido observada como causante de ovulación y de formación de tejido luteal (Lamb, y otros, 2009). Los niveles de FSH se incrementan en amplitud unas horas después del pico de LH, relacionándose con el inicio de la primera oleada folicular que describiremos más adelante en la dinámica folicular. De 12 a 24 horas desde el comienzo del celo, el sistema nervioso central del animal se hace refractario a los estrógenos y todas las manifestaciones de celo o calor desaparecen. Inmediatamente después de finalizado el celo se inicia el metaestro que puede durar de 3 a 5 días.

Durante el metaestro ocurre la ovulación, que tiene lugar entre 28 a 32 horas después de haberse iniciado el celo, o entre 10 a 15 horas de haber cesado los signos de celo en respuesta al pico pre ovulatorio de LH. Después de la ovulación se produce una hemorragia y el folículo se llena de sangre, convirtiéndose en una estructura conocida como cuerpo hemorrágico. El proceso siguiente es la luteinización de las células foliculares que se transforman en células luteales; estos cambios ocurren entre el día 5 a 7 del ciclo, finalizando así la fase de metaestro e iniciándose la fase lútea o diestro.

### **2.3.1.3. Fase luteal o diestro**

Esta fase se caracteriza por la presencia y dominio del cuerpo lúteo en el ovario y la producción de progesterona, y está regulada por las secreciones de la glándula pituitaria anterior, útero, ovario y la presencia de un embrión (Niswender et al., 1976 citado por (Lamb, y otros, 2009)), y va desde el día 5 del ciclo estral hasta el día 18.

La regulación de la secreción de progesterona esta probablemente controlada por un equilibrio de estímulos: uno luteotrópico o que estimula la progesterona y otro luteolítico o que inhibe la progesterona; ambos estímulos son secretados al mismo tiempo durante el ciclo estral (Lamb, y otros, 2009) La hormona LH que es considerada primariamente luteotrópica y la concentración de receptores luteales a la LH están directamente relacionados con los cambios en los niveles de progesterona y el crecimiento del cuerpo lúteo en el ovario. (Lamb, y otros, 2009)

La hormona FSH también interviene uniéndose a receptores en el cuerpo lúteo y provocaría un aumento en la secreción de progesterona. El cuerpo lúteo recibe la mayoría del flujo sanguíneo del ovario y la cantidad de flujo recibido esta altamente relacionado con la cantidad de progesterona producida y secretada. Los niveles de progesterona más altos se alcanzan en torno al día 10 del ciclo estral y se mantienen hasta el día 16 o 18 del ciclo dependiendo de la presencia o no de un embrión.

### **2.3.2. Hormonas Ováricas**

#### **✓ Estrógenos**

Son los responsables del comportamiento sexual de la hembra, estimulan y desarrollan las características sexuales secundarias femeninas, provocan el crecimiento de la estructura glandular del tracto reproductor y de la estructura

y conductos glandulares mamarios, tiene efectos anabólicos; y, de alguna manera, controla la liberación de gonadotropinas hipofisarias por retroalimentación.

Algunos autores reportan la producción de la inhibina en el ovario, que inhibe la liberación de la FSH.

✓ **Progesterona**

Actúa en forma sinérgica con los estrógenos durante las manifestaciones conductuales del estro, provoca la ovulación, estimula la secreción de las glándulas endometriales para favorecer la anidación; y, en el aparato mamario, el crecimiento alveolar; mantiene la gestación; y, por retroalimentación, controla la producción de gonadotropinas.

✓ **Relaxina**

Es reportada por investigadores como la responsable de la relajación de la sínfisis pubiana y de las estructuras del canal del parto durante el trabajo del parto.

## **2.4. MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA OBTENCIÓN DE OVOCITOS**

✓ **Recolección y transporte de los ovarios desde el matadero.**

Se realiza a partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de los folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm (Fernandez, 2011).

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

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

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

Los ovocitos son en general obtenidos en el matadero a partir de ovarios de vacas y vaquillonas no preñadas aunque hasta el momento no existe evidencia que la producción de ovocitos a partir de ovarios con un CL de gestación sea diferente. Los ovarios contienen un gran número de ovocitos en diferentes estadios de desarrollo. El transporte de los ovarios se lleva a cabo en un termo que contiene una solución PBS o en una solución salina a temperatura ambiente pudiéndose conservar entre 20-25 °C durante 6-7 horas sin que afecte la capacidad de desarrollo posterior. En el laboratorio los ovocitos son obtenidos junto a su líquido folicular (Gallego, Garden, & Lopez , 1996).

La recolección de ovocitos provenientes de ovarios obtenidos en rastro se puede hacer por medio de dos métodos: el corte de ovarios y la aspiración con jeringa de folículos superficiales mayores de 2 mm de diámetro (Seneda, Esper, Garcia, Oliveira, & Vantini, 2001) . Los ovarios se transportan al laboratorio en solución salina adicionada con antibióticos (penicilina y estreptomina), a temperatura de 35 a 37 °C. En el laboratorio, se remueve el tejido adyacente, el cuerpo lúteo y la sangre mediante lavados con solución salina (Gordon & LU, 1990). El método de corte consiste en colocar cada uno de los ovarios en cajas de Petri que contienen medio de recolección de ovocitos, y cortar la superficie y el interior de los ovarios a lo largo y a través de éstos con un bisturí, haciendo cortes separados a 2 mm de distancia aproximadamente (Seneda, Esper, Garcia, Oliveira, & Vantini, 2001). En el caso de la aspiración de ovocitos con jeringa, los folículos ováricos superficiales visibles de 2 a 7 mm de diámetro son aspirados con jeringa de 5 o 10 ml y aguja hipodérmica estéril calibre 18, posteriormente el líquido folicular es depositado en cajas de Petri para realizar la búsqueda de los ovocitos aspirados (Lonergan , Vergos, Kinis, Sharif H, & Gordon , 1991). (Seneda, Esper, Garcia, Oliveira, & Vantini, 2001) Compararon los métodos de corte de ovarios y de aspiración de folículos para evaluar el número de

ovocitos recuperados por ovario y la calidad de éstos. Demostraron que por el método de corte se obtiene una mayor cantidad de ovocitos, así como ovocitos de mejor calidad para estudios de fertilización in vitro, en comparación con el número de ovocitos recuperados mediante la aspiración folicular.

La disminución en las tasas de recuperación y producción de embriones en el caso de aspiración folicular puede estar asociada a efectos nocivos sobre las capas de las células del cúmulus ejercidos por la fuerza de aspiración (Hamano & Kuwayama, 1993).

Por otra parte, el mayor número de ovocitos obtenidos por el método de corte puede estar explicado por la recuperación de ovocitos provenientes de folículos menores de 2 mm de diámetro que están en el interior del folículo (Hamano & Kuwayama, 1993)

#### **2.4.1. Método de Slicing**

- Los ovarios se transportan al laboratorio en solución fisiológica a temperatura entre 35-37° C.
- En el laboratorio, se hace remoción del tejido adyacente, del cuerpo lúteo y de sangre con lavados de solución fisiológica.
- Los ovarios serán medidos uno a uno con un pie de rey o calibrador con el fin de relacionar el tamaño del ovario con la cantidad de ovocitos obtenidos.
- El método de corte consiste en colocar cada uno de los ovarios en cajas de Petri que contienen el medio de cultivo y se corta la superficie y el interior de los ovarios a lo largo y a través de éste con cuchillas separadas por 2 mm.

#### **2.4.2. Método de aspiración**

- Los ovocitos obtenidos por aspiración directa de folículos de 2-5 mm de diámetro presentes en la superficie de los ovarios para la aspiración

se utilizan jeringas desechables de 10 ml conteniendo 1 ml de solución salina.

- Los ovarios serán medidos uno a uno con un pie de rey o calibrador con el fin de relacionar el tamaño del ovario con la cantidad de ovocitos obtenidos.
- Para la búsqueda de los ovocitos se emplea el estereoscopio 40x

Los ovocitos se lavan 3 veces en solución fisiológica y se los clasifica. Entre la recuperación de ovocitos post mortem e in vivo hay pocas diferencias, existe un mayor control y facilidad en la punción post mortem del ovario, siendo más difícil la visualización por ecografía, con la donante viva, además, se ha reportado diferencias entre puncionar un ovario con una jeringa y aguja a la aspiración in vivo con una presión de vacío de aspiración ajustable finalmente las ventajas en donantes vivas es el acceso a animales de alta calidad, ya que podemos coleccionar ovocitos repetidamente, incluso en estado de preñez, ayudando a establecer esquemas que permitan incrementar la eficiencia productiva. En el caso de la aspiración trans vaginal guiada por ultrasonidos Ovum Pick Up (OPU) el animal no tiene que tener un ciclo productivo normal, se puede repetir en el mismo animal durante 5 a 6 meses, con una periodicidad de dos aspiraciones por semana o una semanal, sin ningún efecto sobre la reproducción o sobre el bienestar animal cuando se usa conjuntamente con técnicas de FIV, el intervalo generacional disminuye y aumenta la mejora genética maternal produciendo más prole que con métodos convencionales, la tasa de recuperación de ovocitos por OPU están influenciados por la aspiración al vacío antes mencionada, tratamientos hormonales del animal, frecuencia de punción, estado del ciclo, experiencia del operador, teniendo su efecto beneficioso o nocivo en la calidad del ovocito.

### **2.4.3. Clasificación de ovocitos**

La selección de los ovocitos previa a la maduración en bovinos fue reportada inicialmente por Leibfried y First (1979), que demostraron que la capacidad

de maduración nuclear *in vitro* no dependía del tamaño del folículo ni del momento del ciclo estral de la hembra, pero sí las características morfológicas de los ovocitos para su maduración en cultivo.

Una etapa crítica en el procedimiento de fertilización *in vitro* (FIV) es la elección de ovocitos de buena calidad para poder garantizar una óptima sobrevivencia. Por esto, es preferible congelar los mejores óvulos disponibles.

Los 4 aspectos más importantes que evalúan la calidad del óvulo son: estadio nuclear, características citoplasmáticas, aspecto de la corona radiada y la expansión o distribución de las células del *cúmulus*. (Chen, 1986) así como el diámetro de los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110  $\mu\text{m}$  se encuentran todavía en fase de crecimiento y no han adquirido la capacidad para madurar.

Existe controversia en cuanto si se mantiene o no el *cúmulus* para mejorar las tasas de sobrevivencia. De acuerdo con (Chen, 1986) su ausencia facilita la presencia de las células de la granulosa sirve como un escudo contra las modificaciones osmóticas repentinas y el estrés ocasionado por la concentración y dilución de los crioprotectores durante el proceso de equilibrio y remoción de éstos después del descongelamiento.

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



Los ovocitos pueden ser clasificados de acuerdo al número de capas de células del *cúmulus* y la apariencia del citoplasma.

- El tipo A corresponde a un ovocito con células del *cúmulus* con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente.
- El tipo B tiene capas múltiples del *cúmulus* (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras.
- El tipo C se caracteriza por poseer un *cúmulus* denudado y un citoplasma irregular con zonas oscuras.
- El tipo D tiene un *cúmulus* con células expandidas y un citoplasma irregular con zonas oscuras (Lonergan , Vergos, Kinis, Sharif H, & Gordon , 1991).

## 2.5. ASPECTOS GENERALES QUE AFECTAN LA REPRODUCCIÓN

El Manejo de la Biotecnología Reproductiva es multifactorial. En el interviene una serie de elementos que interactúan entre sí de manera estrecha, por lo que la alteración o variación de cualquiera de ellos incide marcadamente en los resultados finales de su aplicación e implementación.

Los Factores que afectan la reproducción son principalmente:

**Sanidad:** Los programas de Sanidad del hato están basados en estrategias tendientes a optimizar la prevalencia de enfermedades y en los últimos años a la erradicación de algunas de ellas sujetas a programas oficiales de control obligatorio como la Brucelosis, Tuberculosis, Encefalitis Espongiforme y Rabia, que interfieren la exportación de productos pecuarios, además de tener carácter zoonótico (Bernardo , 2011).

**Raza - Genética:** El mejoramiento genético tiene como propósito el aumento de la producción del hato y la adaptación a un medio natural específico, lo cual se consigue cuando se escogen animales o embriones, en las mismas condiciones en las que se va a desempeñar su descendencia. Lo anterior es posible mediante la selección, en donde se escogen los animales superiores para que sean los padres o madres de la futura generación, lo que implica descartar como reproductores aquellos que no cumplan con los parámetros establecidos como óptimos, tanto por las Asociaciones respectivas, como por el ganadero en su hato. Esto se ha obviado en parte por la producción de hembras y machos puros adaptados a nuestras zonas de clima cálido.

**Nutrición:** La nutrición es el factor que más influye en la funcionalidad del aparato reproductor. Un desbalance nutricional en exceso o defecto altera el ciclo estral de la hembra y el libido en el macho. Las hembras bovinas son más susceptibles a los efectos nocivos de la obesidad y sobrealimentación en el peri parto, lo cual conduce a la producción de óvulos de inferior calidad, reducción de las tasas de preñez y como consecuencia aumento de la edad al primer parto en novillas y el IEP en vacas.

**Medio Ambiente:** Junto con la nutrición es el factor que más influye en el desempeño reproductivo. El exceso de calor o frío induce el estrés calórico el cual incide negativamente en la producción y aptitud reproductiva del animal. El estrés calórico es la incapacidad del organismo para mantener constante la temperatura corporal u homeostasia. Las primeras respuestas reproductivas al estrés calórico son la disminución de la intensidad y duración del estro, cuya consecuencia es la baja fertilidad. Se sabe que las hembras mamíferas son más sensibles al

estrés calórico durante los 12 días anteriores al estro, aumentando esta sensibilidad durante los dos días previos al mismo.

Al evaluar el efecto del calor sobre los folículos de mayor tamaño en vacas lecheras lactantes, se observó una disminución en el desarrollo del folículo dominante de la primera onda folicular y la pérdida de dominancia del mismo, ya que se ha observado que en vacas con estrés calórico se mantiene el número de folículos medianos, durante el período de dominancia de la primera onda folicular, en comparación con vacas en termo neutralidad. Otra manifestación de la falla de dominancia, es el anticipo en dos días, de la emergencia de un nuevo folículo para la segunda onda de crecimiento folicular, que frecuentemente es recambiado cuando hay estrés térmico después del día 11 del ciclo. La disminución del tamaño de los folículos dominante y subordinado y del volumen del fluido folicular en vacas con estrés calórico, indica que el efecto de calor puede afectar la selección, la dominancia folicular y la calidad de los folículos. Un aspecto adicional, es la presencia incrementada de ovarios quísticos, por efectos de altas temperaturas. Durante el estrés calórico se presenta un retardo en la esteroidogénesis folicular en folículos pre ovulatorios de tamaño medio y baja viabilidad de los folículos pre ovulatorios (Córdova, 2011).

## **2.6. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO**

Los embriones producidos in-vitro se obtienen a partir de óvulos (ovocitos) recuperados de ovarios que pueden provenir de animales que van al matadero o de animales vivos (animales castrados y punción ovárica). Los ovocitos son trasladados al laboratorio, fertilizados y cultivados en estufa durante siete días. Finalizado este período, los embriones producidos están en condiciones de ser transferidos a una vaca receptora, o congelados para ser transferidos en el momento apropiado.

Es una técnica de reciente desarrollo cuyo uso ha comenzado a difundirse a partir de la década del noventa y en forma más amplia en los últimos 3 años.

En producción animal tiene diferentes tipos de aplicaciones, desde aquellas en que está destinada a su uso en programas de mejoramiento genético, que es donde más impacto ha tenido, hasta otras que están relacionadas con el aumento de la eficiencia individual, como es el caso de su utilización para la producción de mellizos en bovinos.

Las técnicas para producir embriones bovinos, mediante la maduración de ovocitos y su posterior fertilización in vitro, ofrece la posibilidad de obtener embriones a bajo costo para ser utilizados con fines de estudio o con propósitos comerciales.

Los embriones se producen a partir de óvulos recuperados de ovarios provenientes de animales faenados o por aspiración folicular en vacas vivas (Ovum Pick Up). Los ovarios son transportados al laboratorio donde se procede a su lavado, acondicionamiento, punción de los folículos, para posteriormente seleccionar los ovocitos más óptimos y colocarlos en medios especiales de maduración, luego serán fecundados con semen elegido por el productor y cultivados en estufas en condiciones atmosféricas especiales durante 7-8 días. Finalizado este periodo los embriones están en condiciones de ser transferidos en fresco a una vaca elegida para este fin o crío preservarlos en termos de nitrógeno líquido hasta su transferencia en el momento apropiado.

### **2.6.1. Sistemas de producción in vitro de embriones**

El proceso de producción in vitro de embriones bovinos puede dividirse en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado, en orden cronológico son:

- ✓ Maduración de ovocitos
- ✓ Fecundación de ovocitos maduros
- ✓ Cultivo de embriones.

Estos tres pasos, comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos, muchos de los cuales son aún desconocidos, condicionando cada uno el éxito o el fracaso del siguiente.

Luego de la maduración in vitro, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar, alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 hs de comenzada la maduración.

De estos, aproximadamente el 80% es fecundado y comienzan a dividirse, al menos, hasta el estadio de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanza el estadio de blastocisto (B) o blastocito expandido (Bex) luego del cultivo durante 6-7 días.

Esto indica que el cultivo embrionario, correspondiente al paso más prolongado dentro del proceso de producción in vitro, es el período en el que se establece el mayor porcentaje de pérdidas del sistema. A su vez, durante esta etapa, se define en gran medida la calidad de los embriones obtenidos. (Felmer R., 2006).

#### **2.6.1.1. Maduración de ovocitos**

La maduración ovocitaria es un fenómeno complejo, durante el cual el ovocito progresa desde el estadio de profase de MI hasta el de MII (maduración nuclear). El ovocito completa la meiosis en respuesta al pico ovulatorio de LH, o bien, cuando es retirado del folículo para llevar a cabo la maduración in vitro. Un periodo de 24h es necesario para que el ovocito bovino complete la maduración nuclear, es decir, alcance el estadio de MII, en el que permanece hasta el momento en que es fertilizado, que es cuando completa la meiosis y se forma los pronúcleos.

Además de la maduración nuclear, también es importante que exista una maduración citoplasmática ya que prepara al ovocito para soportar la fertilización y aportar los nutrientes requeridos para el desarrollo embrionario temprano. De manera natural, la meiosis inicia en el ovario fetal, pero se detiene antes del nacimiento, en la profase (PI) de la primera división meiótica; los ovocitos pasan entonces a la etapa reticulada, que es un estado de reposo

nuclear y que suele durar hasta que se ovula el primer ovocito en la pubertad. Los ovocitos en reposo o inmaduros tienen un gran núcleo denominado vesícula germinal. La meiosis avanza desde la etapa de vesícula germinal o PI hasta la metafase de la segunda división meiótica en la que se detiene una vez más, dando como resultado un primer cuerpo polar que es expulsado al espacio peri vitelino. De la misma manera en la que madura el núcleo se debe llevar a cabo la maduración del citoplasma (Zarate , 2006).

Cuando los ovocitos son aspirados desde los folículos terciarios reanudan espontáneamente la meiosis y al ser cultivados in vitro continúan con los procesos de maduración. De este modo la composición de los medios y el ambiente controlado por estufas de cultivo, deben brindar un ambiente adecuado para que la maduración ocurra en 24hs de un modo similar a lo que sucede in vivo durante más de dos ciclos estrales en el bovino. Las condiciones utilizadas en la mayoría de los laboratorios para lograr este ambiente, involucra el uso de medios de cultivo tales como el TCM-199 suplementado con hormonas (LH, FSH, estradiol, etc.), antioxidantes (glutación, cisteamina, cistina), factores de crecimiento y macromoléculas (suero, albumina), en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 38,5°C y humedad a saturación. (Mucci, Aller, Kaiser, Hozbor , & Alberio , 2006).

#### **2.6.1.2. Fecundación de los ovocitos**

Consiste en incubar los óvulos madurados (producto de la fase anterior) con espermatozoides vivos y móviles durante un periodo de 6 a 24 horas, luego de un proceso de selección y capacitación espermática que nos permitirá a su vez deshacernos de componentes del plasma seminal, crio protectores y espermatozoides muertos o con escasa vitalidad. La capacitación espermática generalmente se logra exponiendo los espermatozoides vivos a concentraciones de heparina y cafeína, entre otras. Estas sustancias logran estimular el proceso de capacitación del espermatozoide que lo prepara para interactuar y fecundar el óvulo.

En el caso de la fecundación in vitro, los ovocitos madurados son co cultivados con espermatozoides en medios especiales y en un ambiente controlado por estufas de cultivo por un tiempo comprendido entre 5-24 hs dependiendo del protocolo, la concentración de espermatozoides y la calidad del semen utilizado.

### **2.6.1.3. Cultivo de embriones**

Aquellos embriones de 4 o más células resultantes de la FIV son cambiados del medio de fecundación a un medio de cultivo embrionario donde los embriones continúan su división celular a 8, 16 y 32 células hasta llegar a mórulas y blastocitos. Al llegar a estos estadios, los embriones pueden ser transferidos a vacas receptoras (en fresco) o congelados para su posterior uso. Durante esta etapa destacan la presencia en el medio de cultivo de diversas fuentes de energía como la glucosa y aminoácidos esenciales y no esenciales (Hernandez , 2005).

Los medios utilizados para el cultivo de los embriones bovinos han sido clasificados en tres categorías: indefinidos, cuando se utiliza suero y co cultivo con células somáticas; semidefinidos, cuando se omite el co cultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica; y definidos, cuando el suero se reemplaza por macromoléculas como el poli vinil alcohol o la poli vinil pirrolidona.

Luego de la maduración in vitro, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar. De estos aproximadamente el 80% son fecundados y comienzan a dividir, al menos, hasta el estadio de 2-4 células. Sin embargo solo un 25-40% alcanzan el estadio de blastocito o blastocito expandido. El cultivo embrionario corresponde al paso más prolongado dentro del proceso, es el periodo que determina la eficiencia global del sistema así como la calidad de los embriones obtenidos. (Mucci, Aller, Kaiser, Hozbor , & Alberio , 2006).





### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIALES**

##### **3.1.1. De laboratorio**

- 200 Ovarios bovinos
- Solución fisiológica al 9%
- Mandil
- Guantes
- Envases
- Cajas Petri
- Estéreo microscopio
- Jeringas de 5-10 cc
- Agujas calibre 18 G
- Micro pipeta
- Cuchillas
- Tubos de ensayo
- Calibrador
- Termo

##### **3.1.2. De oficina**

- Computadora
- Cámara fotográfica
- Flash memory
- Marcador permanente
- Etiquetas

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Ubicación

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Reproducción animal de la Universidad Nacional de Loja, el mismo que se encuentra ubicado en la quinta experimental Punzara al sur occidente de la hoya de Loja, a una altitud de 2250 metros sobre el nivel del mar, posee una temperatura promedio de 16°C, con una humedad relativa de 65%, ubicada en la zona de vida bosque seco montano bajo.

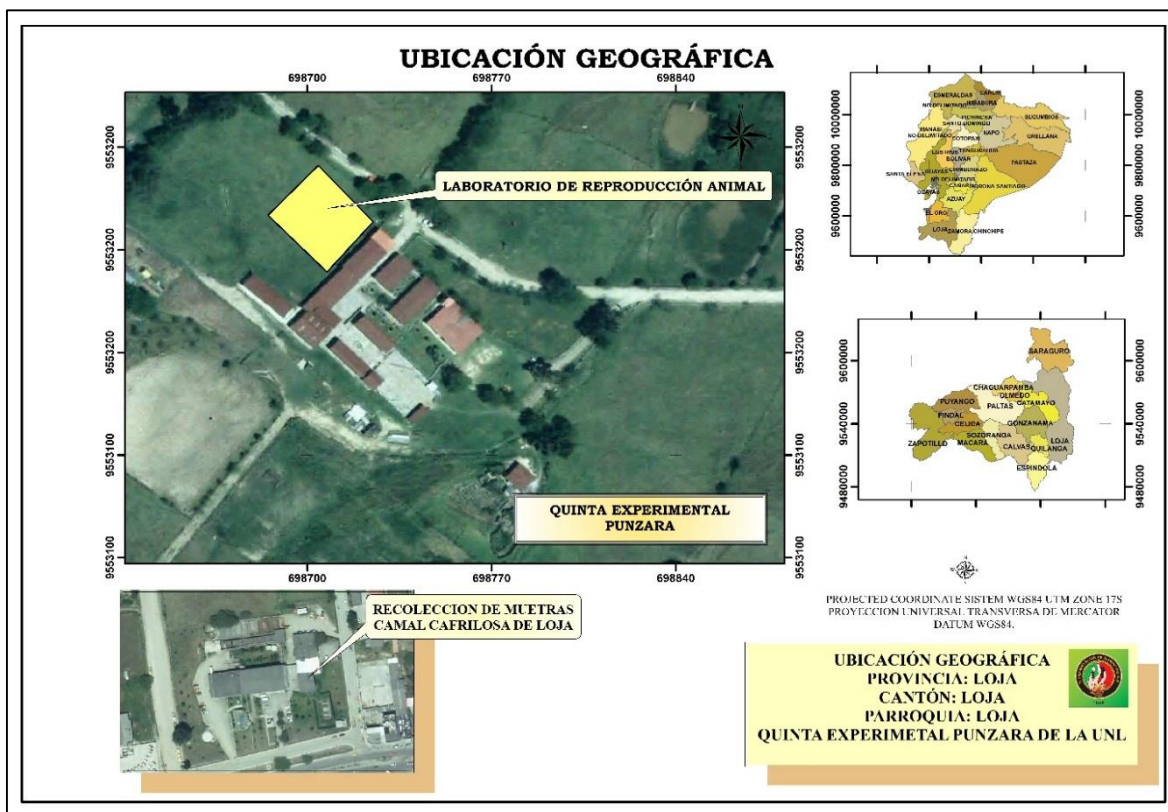


Figura 1. Ubicación Geográfica.

Fuente: SENPLADES - IGM

### 3.2.2. Unidades experimentales

Se seleccionaron 200 ovarios de vacas sacrificadas en el camal de la ciudad de Loja, considerando las siguientes características: ciclicidad, presencia de

cuerpos lúteos, tamaño de los folículos e integridad de los mismos. Los ovarios se transportaron en solución fisiológica al 0,9%, a una temperatura entre 30 – 35°C, hasta el laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional de Loja, Alrededor de 1 hora post-recolección los ovarios, se lavaron por tres veces en solución fisiológica al 0,9%. De los 200 ovarios recolectados 100 de ellos fueron evaluados con el método de aspiración folicular los 100 restantes con el método de Slicing.

### **3.2.3. Recolección de ovocitos**

#### **a. Método de aspiración folicular**

Los ovocitos se obtienen por aspiración directa de folículos de 2-5 mm de diámetro presentes en la superficie de los ovarios para la aspiración se utilizan jeringas desechables de 10 ml conteniendo 1 ml de solución fisiológica al 9% previamente calentada a 35 °C el líquido obtenido se coloca en cajas petri para la observación y conteo de ovocitos utilizamos un estereoscopio con el lente de 40x. A continuación se aspira cuidadosamente con una pipeta y se los coloca en un pocillo para su clasificación. Se procederá a tomar las medidas de las muestras con un calibrador con el fin de determinar la relación que puede existir entre el tamaño del ovario y la cantidad de ovocitos.

#### **b. Método de Slicing**

Consiste en la recuperación de ovocitos mediante el Slicing de los ovarios. Inicia con la remoción del tejido adyacente, del cuerpo lúteo y de sangre con lavados de solución fisiológica al 9% previamente calentada a 35 °C se coloca cada uno de los ovarios en cajas Petri que contienen la solución fisiológica al 9%, se realizan cortes horizontales y verticales a la superficie e interior del ovario, estos cortes se los realiza con un bisturí y a una distancia de 2mm cada uno. El líquido que se acumula en la caja petri se lo coloca en tubos de ensayo y se deja reposar durante 10 minutos, luego con una pipeta se extrae el líquido de la superficie y se observa en el estereoscopio donde se realizara el conteo y posteriormente la clasificación de los ovocitos.

### **3.2.4. Clasificación de ovocitos**

Los ovocitos pueden ser clasificados de acuerdo al número de capas de células del *cúmulus* y la apariencia del citoplasma.

- ✓ El tipo A corresponde a un ovocito con células del *cúmulus* con número de capas múltiples (mayor a 4 capas) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente.
- ✓ El tipo B tiene capas múltiples del *cúmulus* (de 1 a 3 capas) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras.
- ✓ El tipo C se caracteriza por poseer un *cúmulus* denudado y un citoplasma irregular con zonas oscuras.
- ✓ El tipo D tiene un *cúmulus* con células expandidas y un citoplasma irregular con zonas oscuras (Lonergan , Vergos, Kinis, Sharif H, & Gordon , 1991).

### **3.3. VARIABLES EN ESTUDIO**

Las variables que se estudió en la presente investigación fueron:

- Tamaño de ovario
- Relación tamaño-ovario
- Número de ovocitos
- Calidad de los ovocitos

### **3.4. TOMA Y REGISTRO DE DATOS**

#### **3.4.1 Tamaño de Ovarios**

El tamaño de los ovarios se clasificó en tres grupos:

- ✓ Pequeño >2<4cm
- ✓ Mediano >4<5cm

- ✓ Grande >5cm

### **3.4.2 Relación tamaño – calidad**

Para el análisis de esta variable se tomó la siguiente información: El tamaño de los ovarios de los tres grupos propuestos y relacionarlo con la cantidad de ovocitos de calidad recuperados en cada grupo.

### **3.4.3 Número de ovocitos recuperados**

Para el análisis de esta variable se tomó la siguiente información: Número de ovocitos recuperados por el método de aspiración folicular y el número de ovocitos recuperados por el método de Slicing.

### **3.4.4 Calidad de ovocitos**

Se evaluó la cantidad de ovocitos que pueden ser utilizados en proceso de producción de embriones in vitro que se recuperaron en cada método propuesto. Se utilizó la siguiente escala:

- ✓ Excelente (A)
- ✓ Bueno (B)
- ✓ Regular (C)
- ✓ Degenerado (D)

Los ovocitos de calidad **A** y **B** son los que se utilizan en procesos de producción de embriones in vitro.

## **3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico incluyó una valoración descriptiva de las variables en estudio, análisis de varianza y la prueba de Chi- cuadrado; con la ayuda del programa SPSS "Statistical Product and Service Solutions"

## 4. RESULTADOS

### 4.1. TAMAÑO DE LOS OVARIOS OBTENIDOS

Los ovarios obtenidos en el camal se dividieron en tres grupos según su tamaño: Pequeño  $>2<4\text{cm}$ , Mediano  $>4<5\text{cm}$  y Grande  $>5\text{cm}$ , conforme se detalla en el cuadro 9.

Tabla 1. Tamaño de los ovarios obtenidos en el Camal Frigorífico de Loja

Tamaño	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Pequeño	899	66,2	66,2	66,2
Mediano	388	28,6	28,6	94,8
Grande	70	5,2	5,2	100
Total	1357	100	100	

Se realizó una clasificación en tres grupos según el tamaño de los ovarios obteniendo un 66,25% de ovarios de tamaño pequeño, un 28,59% de tamaño mediano y un 5,16% de tamaño grande. La mayoría de muestras analizadas se realizaron en ovarios de tamaño pequeño ( $>2\text{cm} <4\text{cm}$ ), como se puede observar en la figura 2.

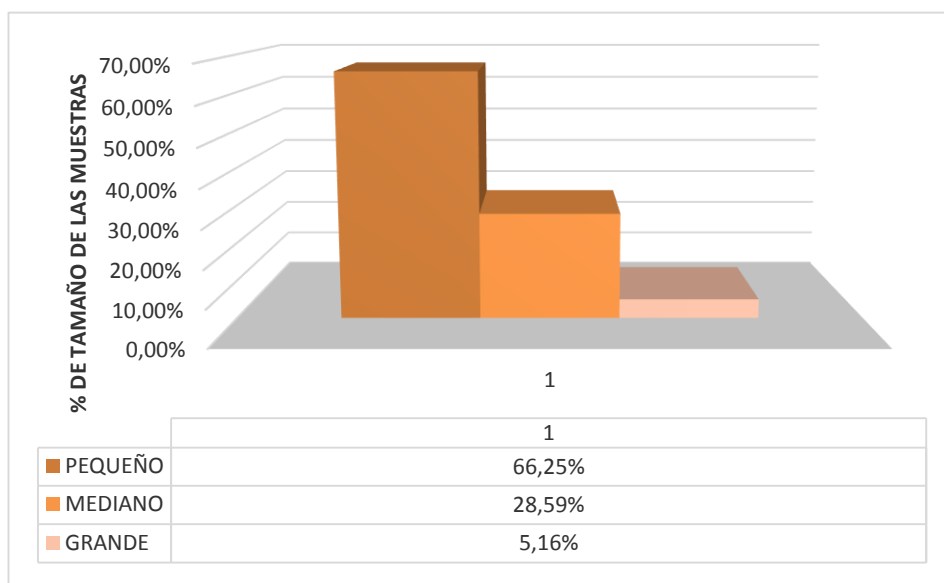


Figura 2. Porcentaje del tamaño de las muestras

## 4.2. RELACIÓN TAMAÑO – CALIDAD

Tabla 2. Calidad en función del tamaño de la muestra.

Recuento		Tamaño			Total
		Pequeño	Mediano	Grande	
Calidad	Excelente	230	96	22	348
	Buena	145	72	11	228
	Regular	222	104	9	335
	Mala	302	116	28	446
Total		899	388	70	1357

La mayoría de ovocitos que cumplen con las normas impuestas por la asociación internacional de transferencia de embriones se obtuvieron en ovarios tamaño pequeño (>2cm<4cm).

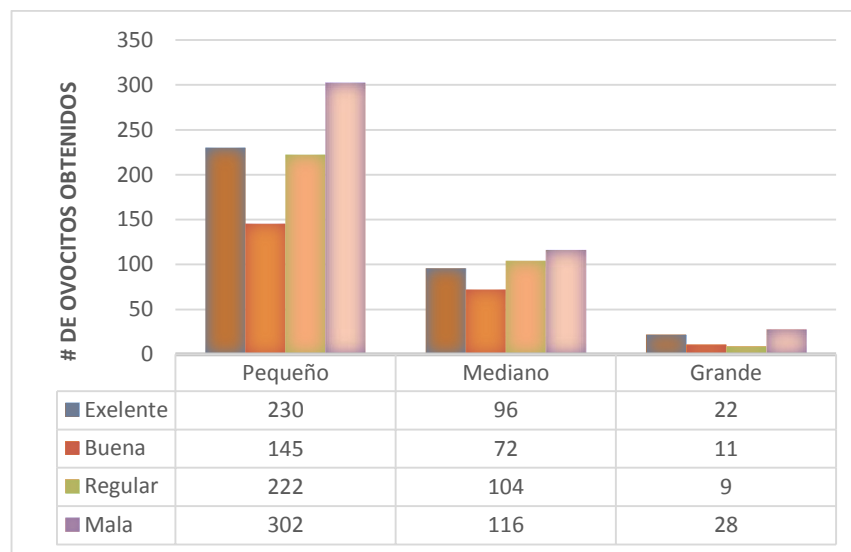


Figura 3. Calidad en función del tamaño de la muestra.



### 4.3. NÚMERO DE OVOCITOS

Tabla 3. Número de ovocitos recuperados con los métodos de estudio

Método	Frecuencia	Porcentaje
Aspiración folicular	604	44,5
Slicing	753	55,5
Total	1357	100

De acuerdo a los resultados en el método de aspiración folicular se obtuvo un total de 604 ovocitos que corresponden al 44,51%; mientras en el método de Slicing se obtuvo un total de 753 ovocitos proporcionando un 55,49%.

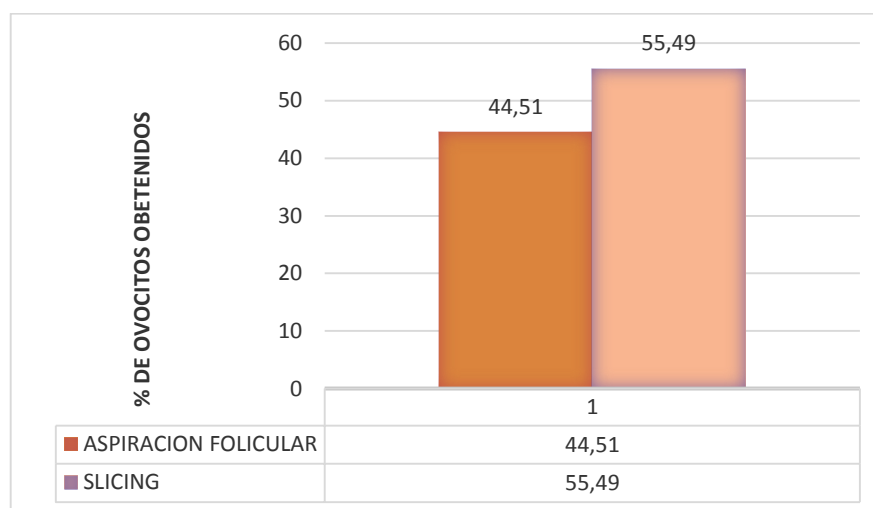


Figura 4. Porcentaje de ovocitos que se obtuvo a través de los métodos de aspiración folicular y Slicing.

### 4.4. CALIDAD DE OVOCITOS

Tabla 4. Número de ovocitos de calidad obtenidos en los métodos propuestos.

Calidad	Aspiración Folicular		Slicing		total
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	
Excelente	165	27,3	183	24,3	348
Buena	116	19,2	112	14,9	228
Regular	123	20,4	212	28,2	335
Mala	200	33,1	246	32,7	446
<b>Total</b>	<b>604</b>	<b>100,0</b>	<b>753</b>	<b>100</b>	<b>1357</b>

De acuerdo a los resultados encontrados con el método de recuperación de ovocitos aspiración folicular se obtuvo 27.20% excelentes , 19.50% buenos , 20.40% regulares y un 32.90% de mala calidad. Esto constituye un 46.7% de ovocitos recuperados recomendados por la asociacion internacional de transferencia de embriones.En relacion a la calidad de ovocitos el método de slicing obtuvo 24.20% excelentes, 14.90% buenos un 28.20% regulares, 32.80% de mala calidad. Se muestra que se recolecto un 39.1% de ovocitos recomendables para la producción de embriones.

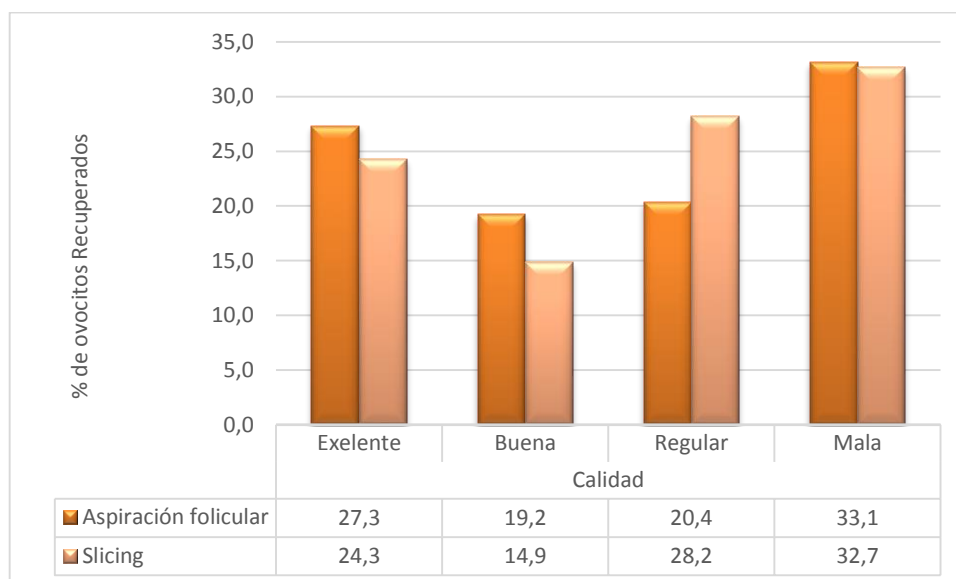


Figura 5. Calidad de ovocitos recuperados.

## 5. DISCUSIÓN

En relación al número de ovocitos, los resultados demuestran que con el método de aspiración folicular se obtuvo 604 ovocitos, equivalente al 44,51%, y con el método Slicing se obtuvo 753 ovocitos que representa el 55.49%, resultados que demuestran que la metodología de mayor eficacia en base a esta variable es el método de Slicing. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Hernández-Fernández et al. (2010), donde encontraron 60.76% y 39.24% de ovocitos para la técnica de Slicing y aspiración folicular respectivamente. Como se aprecia los resultados expuestos por Seneda et al. (2001), quien comparó los métodos de Slicing y de aspiración de folículos para evaluar el número de ovocitos recuperados por ovario demostrando que por el método de Slicing se obtiene una mayor cantidad de ovocitos en comparación con el número de ovocitos recuperados mediante la aspiración folicular.

Otros autores como Hamano y Kuwayama (1993), reportan resultados similares a los citados en la presente investigación reportando un mayor número de ovocitos con el método de Slicing. Sin embargo, Arlotto et al. (1996) sostienen que estos ovocitos tienen poco potencial para sufrir maduración meiótica y desarrollo embrionario, comparado con los ovocitos recuperados de los folículos presentes en la superficie del ovario, ya que los ovocitos de folículos internos pueden no haber adquirido aún la competencia para la maduración y desarrollo.

Dentro de la variable de calidad de ovocitos recuperados en cada metodología evaluada se obtuvo en el método de aspiración folicular un 46.7% de ovocitos y en el método de slicing se recolectó un 39.1% de ovocitos recomendables para la producción de embriones. Velarde (2005), encontró que con el método de Slicing, de folículos se obtiene una mayor proporción de ovocitos y de excelente calidad para estudios in vitro comparado con el método de aspiración. Estos resultados difieren de los obtenidos en la presente investigación ya que con el método de Slicing se obtiene una menor cantidad de ovocitos de buena calidad. Por otro lado Gómez, et al, (2012), mencionan que encontraron un 46.31% de ovocitos aptos para la FIV y producción de embriones in vitro método de Slicing y un 48.83% en el

método de aspiración folicular lo que concuerda con esta investigación ya que se encontró 39.1% de ovocitos aptos en el método de Slicing y un 46.7% en el de aspiración folicular.

Cabe mencionar que Hamano y Kuwayama (1993), asocia la disminución en las tasas de recuperación y producción de embriones en el caso de aspiración folicular ya que puede estar asociada a efectos nocivos sobre las capas de las células del *cúmulus* ejercidos por la fuerza de aspiración estos resultados no son precisamente lo que se obtuvo en la presente investigación ya que se recuperó un mayor número de ovocitos de buena calidad empleado este método. Por otro lado Takagi, et al, menciona mayores valores para el método de aspiración en cuanto a calidad de ovocitos, que para el método de corte seriado lo que muestra que coincide con los resultados que obtuvo esta investigación, esto podría deberse a la edad de los animales.

## **6. CONCLUSIONES**

- De total de ovarios seleccionados para el estudio, el 66,25% fueron de tamaño pequeño, el 28,59% de tamaño mediano y un 5,16% de tamaño grande.
- Se obtuvo mayor cantidad de ovocitos de buena calidad en ovarios de tamaño pequeño que se encuentran entre > 2cm y <4cm.
- El método Slicing permitió la recolección de mayor número de ovocitos con 725 que representa el 55.49%; mientras que con el método de aspiración folicular se logró recolectar 604, es decir el 44,5%.
- El porcentaje de ovocitos buena calidad para la producción de embriones *in vitro* fue significativamente mayor con el método de aspiración folicular.

## 7. RECOMENDACIONES

- Utilizar ovarios de tamaño pequeño en el rango de > 2cm hasta <4cm, ya que permite obtener ovocitos de mejor calidad para la producción de embriones in vitro.
- Aplicar el método de aspiración folicular para la obtención de una mayor cantidad de ovocitos de buena calidad para la producción de embriones.
- Continuar con nuevos trabajos de investigación relacionados con la obtención de ovocitos, utilizando características macroscópicas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Akatov, V., Konov, G., Paspelov, A., & Smirnov, L. (1977). *Veterinarnoe akusherstvo i Ginekologija*. MOSCU: MEDLINE.pags. 9-12
- Arlotto T., S. J. (1996). *Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocyte* (45 ed.). Theriogenology .
- Bernardo , G. (2011). *situación de Enfermedades Bovinas no sujetas al control*. Bogota: FENDEGAN.pags. 10-15
- Blanco , D. (2008). *Ciclo Estral*. Buenos Aires : SINTEX. Obtenido de [www.engormiz.com](http://www.engormiz.com). págs 1-4.
- Chen, C. (1986). *Pregnancy after human oocyte cryopreservation* (Vol. 327). London: Elsevier B.V. págs. 884-886
- Córdova. (2011). *Efecto de la mastitis y el estres sobre la reproducción de la Vaca*. Bogota: FENDEGAN.págs 1-6.
- Curtis, H., Barnes, S., Schnek , A., & Massarini, A. (2009). *BIOLOGIA*. Buenos Aires: Medica Panamericana.págs. 895-910
- Diez, C., Duque, P., Gomez, E., Hidalgo, C., Tamayo , C., Rodriguez, A., . . . Vargas, S. (2005). *Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: affects on ultrstructure and developmental ability*. asturias, España: MEDLINE.págs. 317-333
- Drew, M., & Noden, A. (1990). *Embriología de Los Animales Domesticos*. (132, Trad.) Zaragoza. España: ACRIBIA.págs. 12-17
- Fabbri R., P. E. (2000). *Technical aspects of oocyte cryopreservation*. págs39-42 (vol.169)
- Felmer R. (2006). *Producción in vitro de embriones bovinos*. Balcarce, Argentina : SCIELO. Obtenido de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2006000200002](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2006000200002). págs94-104
- Fernandez, A. (2003). *Dinamica folicular: Funcionamiento y Regulación*. Montevideo - Uruguay: SINTEX. Obtenido de [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar). págs1-5

- Fernandez, P. (2011). *Fecundación in vitro : Alternativas para la mejora Genética en Bovinos*. Cuenca: UNIVERSIDAD DE CUENCA. págs12-20
- Gallego, J., Garden, L., & Lopez , M. (1996). *Nuevas Tecnicas de Reproducción Asistida aplicadas a la producción animal*. Castilla : Universidad de castilla la macha- Cuenca . págs. 83-86
- Gordon , I., & LU, H. (1990). *Production of embryos in vitro and its impact on livestock production* (Vol. 33). Theriognolgy. págs77-78.
- Hafez. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Mexico: Interamericana, Mexico. págs. 33-36.
- Hamano, S., & Kuwayama, M. (1993). *In vitro fertilization and development of bovine oocyte recovered from the ovaries of the individual donors:a comparison between the cuttin and aspiration metthod*. (Vol. 39). Tokio, Japon : PUBMED. págs 703-712
- Hernandez , H. (2005). *fecundación in vitro*. Maracaibo, Venezuela: Universidad de Zulia. págs. 12-15
- Lamb, G., Smith, G., Perry, J., Atkins, M., Risley, D., Busch, D., & Patterson, D. (2009). *Reproductive endocrinology and hormonal control of the estrous cycle* (Vol. 44). Florida : BOVINE PRACTITIONE . págs18-26
- Lonergan , P., Vergos, E., Kinis, A., Sharif H, & Gordon , I. (1991). *the effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for IMV*. (Vol. 33). California : PUBMED. págs 231
- Lucy, M. (2006). *Biology and improving estrous detection*. Ohaio: Dairy Cattle Reproductive Council Annual . págs 29-37
- Magistrini M., S. D. (2009). *Effects of could and of isopropyl N phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse occyte*. págs.699-707
- McWilliams , B., Gibbons, W., & Leibo, S. (1995). *Osmotic and physioloal responses of mause zygotes and human oocytes to mono and disacharides*. Reproduction Human. págs 71
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G., Hozbor , F., & Alberio , R. (2006). *Produccion in vitro y criopreservacion de embriones bovinos*. Buenos Aires, Argentina: SCielo. Obtenido de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2006000200002](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2006000200002) págs 1-35



- Nalvandov, A. (1969). *Fisiología de la reproducción*. Zaragoza - España: ACRIBIA.
- Palma , G. A. (2001). *Biotecnología de la Reproducción* (Primera Edición ed.). Argentina: Gustavo A. Palma . págs 37-38
- Rivera, H. (2009). *Revisión anatómica del aparato reproductor de las vacas*. Minieapolis MN: Dairy Cattle Reproduction Conference. Obtenido de <http://www.dcrcouncil.org/media/Public/Rivera%20DCRCH%202009.pdf>
- Sartory M., W. A. (2006). *Physiological classification of anovulatory conditions in cattle* págs. 93-125
- Seneda, M., Esper, C., Garcia, J., Oliveira, J., & Vantini, R. (2001). *Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery*. (Vol. 67). Elsevier Science B.V. págs 59-72
- Shearer, J. (2003). *Reproductive Anatomy and Physiology of Dairy Casttle*. Florida: PUBMED.
- Tribulo , S. (2008). Impacto Economico De La Biotecnología. *REVISTA GENETICA BOVINA*, págs 8-9.
- Vatti, G. (1993). *Manual de obstetricia y Genecología Veterinaria*. Mexico DF, Mexico: Noriega. págs. 512
- Webb, R., Gosden , R., Telfer, E., & Moor, R. (1999). *factors affecting folliculogenesis in ruminants*. California , EEUU: PUBMED. págs 257-284
- Yanguma. (2009). Aparato Reproductor De la Hembra Bovina. *REPRODUCCION BOVINA*, págs 54-62.
- Zarate , O. (2006). *Comparción de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos*. Veracruz - Mexico: Universidad de Veracruz . págs 6.

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1. TRABAJO DE CAMPO



Foto 1. Camal Cafrilosa



Foto 2. Materiales

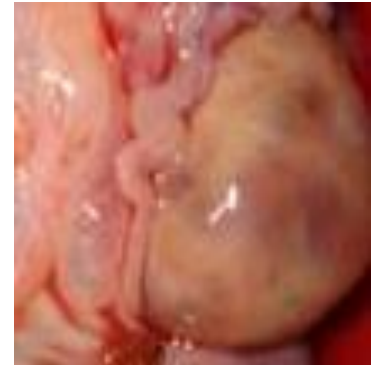


Foto 3. Muestras



Foto 4. Materiales de conteo para ovocitos



Foto 5. Conteo de ovocitos

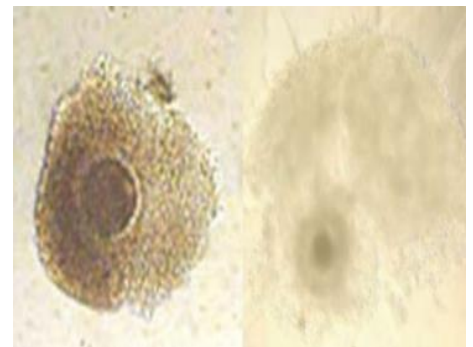


Foto 6. Ovocito de calidad A



Foto 7. Ovocito de calidad B



Foto 8. Ovocito de calidad C

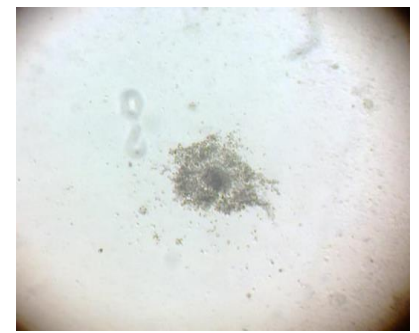


Foto 9. Ovocito de calidad D



Foto 10. Revisión de la técnica Slicing

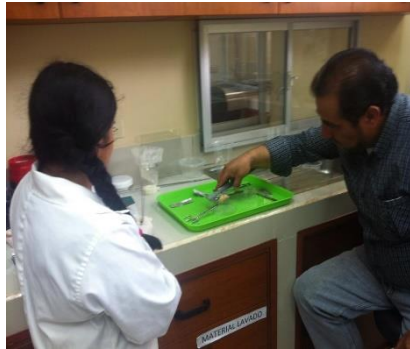


Foto 11. Medición del ovario

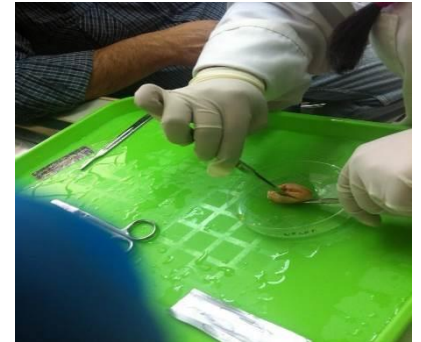


Foto 12. Slicing del ovario



Foto 13. Preparación de la muestra

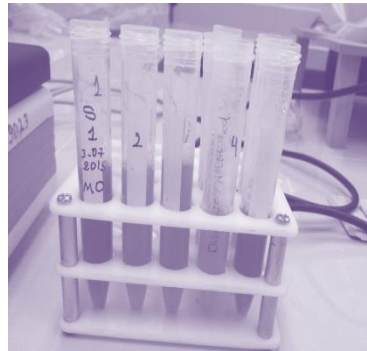


Foto 14. Muestras en reposo



Foto 15. Ovario según el método de Slicing

## ANEXO 2

### PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

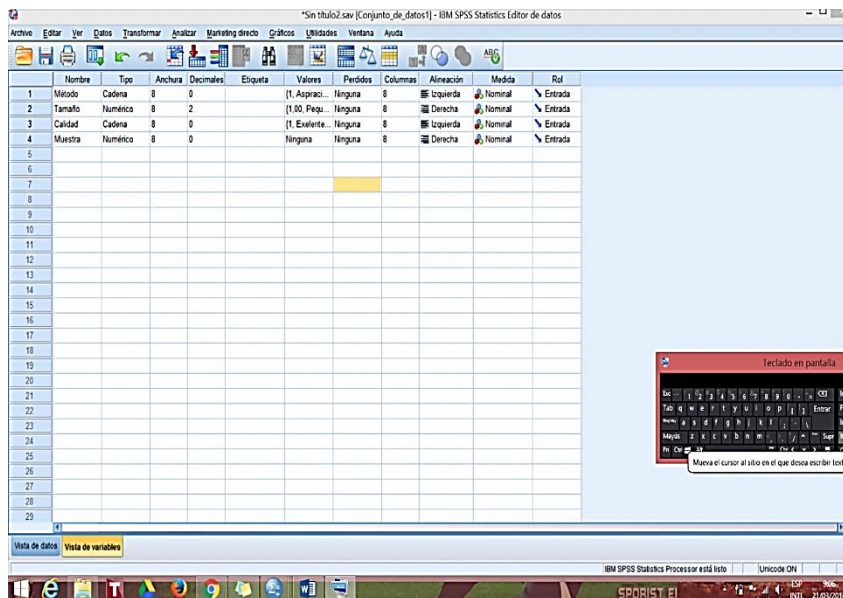
Los registros de las actividades del muestreo de los diferentes métodos se los agrupó de acuerdo al siguiente registro:

**Cuadro 1.**

MÉTODO DE ASPIRACIÓN DE OVOCITOS									
tamaño del ovario		número de ovocitos/ovario		categorización de ovocitos				calidad	
ID	L			A	B	C	D	Buena	Mala
A									
Promedio									

### Análisis Estadístico

- **Variables introducidas en el programa**



**Figura 6.** Variables

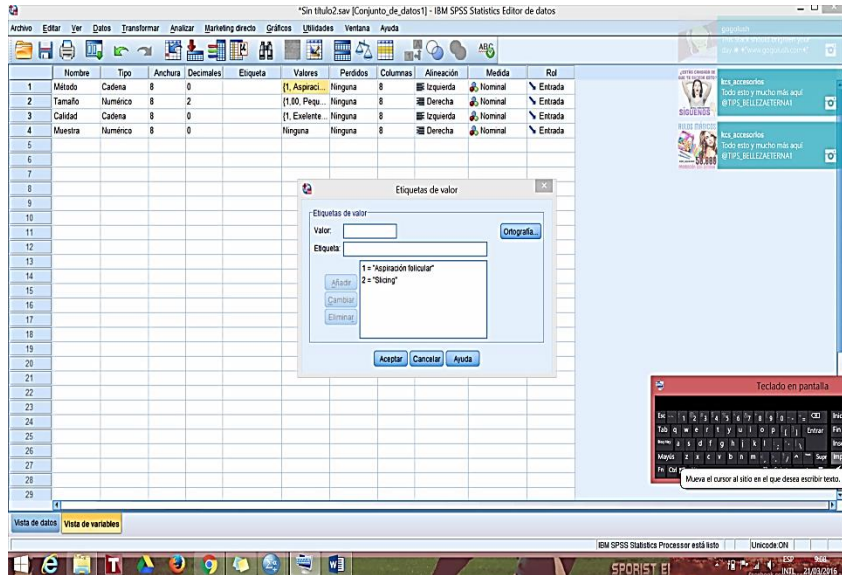


Figura 7. Se dio valores a cada dato

- Frecuencias

Tabla 5. Análisis estadístico

Estadísticos				
		Método	Tamaño	Calidad
N	Válido	1357	1357	1357
	Perdidos	0	0	0
Media			1,3891	
Mediana			1,0000	
Moda			1,00	
Desviación estándar			,58405	
Varianza			,341	

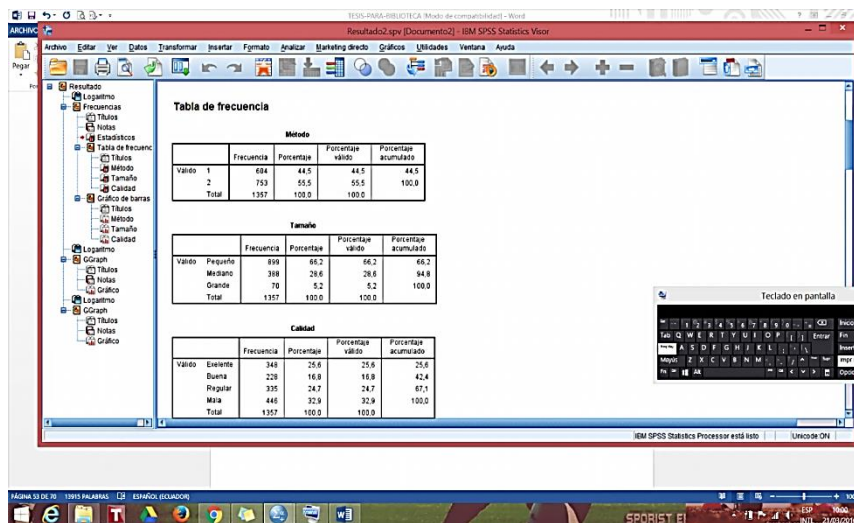


Figura 8. Tabla de frecuencia

**Tabla 6.** Frecuencias de los métodos aplicados

<b>Método</b>					
		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Porcentaje válido</b>	<b>Porcentaje acumulado</b>
Válido	1	604	44,5	44,5	44,5
	2	753	55,5	55,5	100,0
	Total	1357	100,0	100,0	

Se dio el valor de 1 al método de aspiración folicular y 2 al de Slicing.

**Tabla 7.** Frecuencias del tamaño de los ovarios

<b>Tamaño</b>					
		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Porcentaje válido</b>	<b>Porcentaje acumulado</b>
Válido	Pequeño	899	66,2	66,2	66,2
	Mediano	388	28,6	28,6	94,8
	Grande	70	5,2	5,2	100,0
	Total	1357	100,0	100,0	

**Tabla 8.** Frecuencias de la calidad de los ovocitos recuperados.

<b>Calidad</b>					
		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Porcentaje válido</b>	<b>Porcentaje acumulado</b>
Válido	Excelente	348	25,6	25,6	25,6
	Buena	228	16,8	16,8	42,4
	Regular	335	24,7	24,7	67,1
	Mala	446	32,9	32,9	100,0
	Total	1357	100,0	100,0	

## Prueba de chi cuadrado

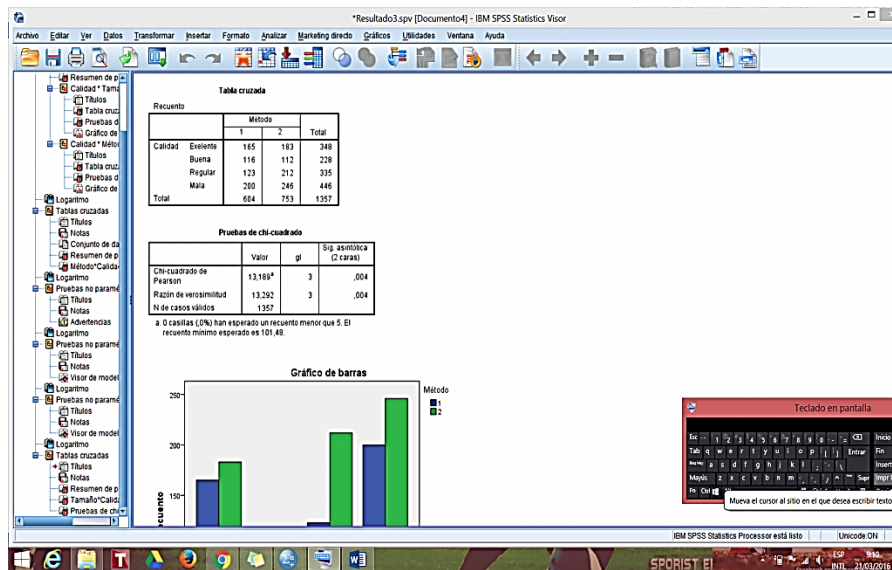


Figura 9. Prueba de chi cuadrado calidad – Método

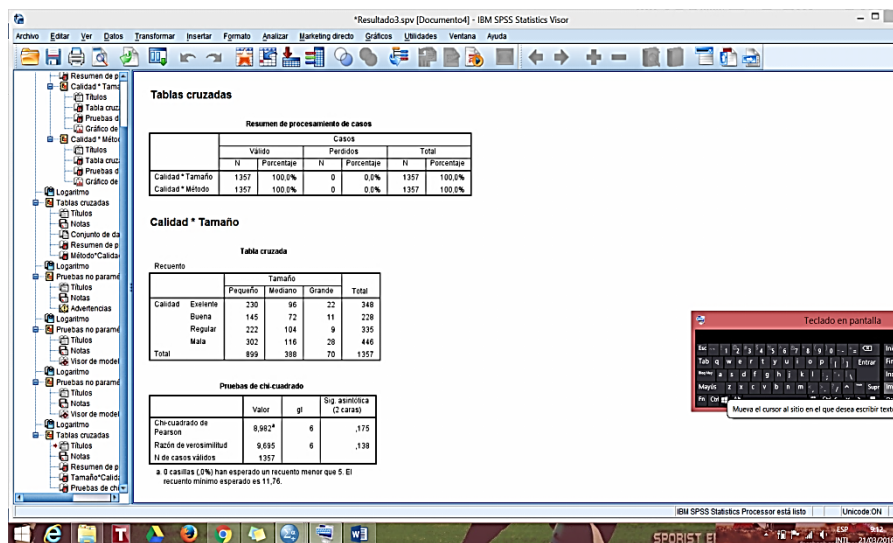


Figura 10. Prueba de chi cuadrado calidad – Tamaño

**Tabla 9. Cruzada**

Tabla cruzada					
Recuento					
		Tamaño			Total
		Pequeño	Mediano	Grande	
Calidad	Excelente	230	96	22	348
	Buena	145	72	11	228
	Regular	222	104	9	335
	Mala	302	116	28	446
Total		899	388	70	1357

**Tabla 10. Pruebas de chi-cuadrado**

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	8,982 <sup>a</sup>	6	,175
Razón de verosimilitud	9,695	6	,138
N de casos válidos	1357		

a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 11,76.

El valor de significancia es menor que el (0.05), por lo que se rechaza la hipótesis de independencia entre estas dos variables.

**Tabla 11. Cruzada**

Tabla cruzada				
Recuento				
		Método		Total
		1	2	
Calidad	Excelente	165	183	348
	Buena	116	112	228
	Regular	123	212	335
	Mala	200	246	446
Total		604	753	1357



**Tabla 12.** Pruebas de chi-cuadrado

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
<b>Chi-cuadrado de Pearson</b>	13,189 <sup>a</sup>	3	,004
<b>Razón de verosimilitud</b>	13,292	3	,004
<b>N de casos válidos</b>	1357		

a. 0 casillas (,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 101,48.

El valor es menor que el (0.05), por lo que se rechaza la hipótesis de independencia entre estas dos variables.

**Resumen de contrastes de hipótesis**

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	Las categorías definidas por Método = Aspiración folicular y Slicing se producen con probabilidades 0,5 y 0,5.	Prueba binomial para una muestra	,000	Rechace la hipótesis nula.
2	Las categorías de Tamaño se producen con probabilidades de igualdad.	Prueba de chi-cuadrado para una muestra	,000	Rechace la hipótesis nula.
3	Las categorías de Calidad se producen con probabilidades de igualdad.	Prueba de chi-cuadrado para una muestra	,000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

**Figura 11.** Resumen de contrastes de hipótesis