

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI



**FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS
AMBIENTALES**

ESCUELA DE DESARROLLO INTEGRAL AGROPECUARIO

“Determinación de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem a varios periodos de tiempo en el Camal Municipal de Tulcán”

Tesis de grado previa la obtención del título
de Ingeniera en Desarrollo Integral Agropecuario

AUTORA: Diana Karolina Sierra Bolaños

ASESOR: Dr. Luis Rodrigo Balarezo Urresta

TULCÁN - ECUADOR

AÑO: 2015

CERTIFICADO.

Certifico que la estudiante Diana Karolina Sierra Bolaños con el número de cédula 040164479-4 ha elaborado bajo mi dirección la sustentación de grado titulada: “Determinación de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem a varios periodos de tiempo en el Camal Municipal de Tulcán”.

Este trabajo se sujeta a las normas y metodología dispuesta en el reglamento de Grado del Título a Obtener, por lo tanto, autorizo la presentación de la sustentación para la calificación respectiva.

Dr. Luis Balarezo

Tulcán, 18 de diciembre de 2014

AUTORÍA DE TRABAJO.

La presente tesis constituye requisito previo para la obtención del título de Ingeniero en Desarrollo Integral Agropecuario de la Facultad de Industrias Agropecuarias Y Ciencias Ambientales.

Yo, Diana Karolina Sierra Bolaños con cédula de identidad número 040164479-4 declaro: que la investigación es absolutamente original, autentica, personal y los resultados y conclusiones a los que he llegado son de mi absoluta responsabilidad.

.....

Diana Karolina Sierra Bolaños
Tulcán, 18 de diciembre de 2014

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DE TESIS DE GRADO.

Yo Diana Karolina Sierra Bolaños, declaro ser autor del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la resolución del Consejo de Investigación de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi de fecha 21 de junio del 2012 que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través o con el apoyo financiero, académico o institucional de la Universidad”.

Tulcán, 18 de diciembre de 2014

Diana Karolina Sierra Bolaños
CI 040164479-4

AGRADECIMIENTO.

Agradezco sobre todo a Dios, por darme la vida, salud y la felicidad de culminar con éxito mis estudios superiores.

A mi familia por estar pendiente de mí en cada momento, por su paciencia y amor, gracias por apoyarme y aconsejarme cuando más lo he necesitado
Agradezco sinceramente a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales, especialmente a la Escuela de Desarrollo Integral Agropecuario y a todos los docentes que la conforman, quienes me educaron y aconsejaron durante el transcurso de mi formación académica.

Agradezco a los miembros del tribunal de tesis, Dr. Luis Balarezo como Tutor, y al Ing. Fausto Montenegro como Biometrista, por la orientación y ayuda que me brindaron para la culminación de la presente investigación.

DEDICATORIA.

Esta tesis está dedicada a Dios que estuvo a mi lado en el largo camino trascendido, guiándome con su luz y ayudándome a ser mejor con las pruebas que me han colmado de fortaleza, firmeza y sabiduría.

Con mucho cariño dedico también este trabajo a mi familia que me acompañó en todo momento con su amor y consejos encaminados para que yo pueda culminar mi meta.

ÍNDICE GENERAL

CERTIFICADO.....	i
AUTORÍA DE TRABAJO.....	ii
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DE TESIS DE GRADO.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
DEDICATORIA.....	v
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN EJECUTIVO	- 1 -
ABSTRACT.....	- 2 -
TUKUYSHUK RANAKU	- 3 -
INTRODUCCIÓN	- 4 -
I. EL PROBLEMA.....	- 5 -
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	- 5 -
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	- 6 -
1.3. DELIMITACIÓN.....	- 7 -
1.4. JUSTIFICACIÓN.....	- 8 -
1.5. OBJETIVOS.....	- 10 -
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	- 11 -
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	- 11 -
2.3. FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA.....	- 15 -
2.4. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA	- 16 -
2.4.1. Ciclo Ovárico.....	- 16 -
2.4.2. Ovogénesis	- 17 -
2.4.3. Foliculogénesis	- 18 -
2.4.4. Maduración del Ovocito	- 19 -
2.4.5. Biotecnología de la reproducción.....	- 21 -

2.4.6. Técnica de la maduración ovocitaria.....	- 22 -
2.4.7. Obtención de ovarios post mortem	- 22 -
2.4.8. Selección del Folículo	- 23 -
2.4.9. Obtención de ovocitos	- 24 -
2.4.10. Selección de ovocitos	- 25 -
III. METODOLOGÍA.....	- 29 -
3.1. MODALIDAD DE LA INVESTIGACIÓN.	- 29 -
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	- 29 -
3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN.....	- 30 -
3.3.1. Población:.....	- 30 -
3.3.2. Muestra:.....	- 30 -
3.5. RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN.	- 33 -
3.5.1. Información bibliográfica.	- 33 -
3.5.2. Información procedimental.....	- 33 -
3.5.7. Recolección de las muestras	- 35 -
3.5.8. Variables a evaluarse.	- 35 -
3.6. PROCESAMIENTO, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	- 42 -
3.6.1. Análisis de resultados.	- 42 -
3.6.2. Verificación de hipótesis.....	- 52 -
IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	- 53 -
4.1. CONCLUSIONES.....	- 53 -
4.2. RECOMENDACIONES.	- 54 -
V. BIBLIOGRAFÍA	- 55 -
VI. ANEXOS.	- 58 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características de la Ubicación.....	- 7 -
Tabla 2: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	- 32 -
Tabla 3: Descripción de los factores en estudio.	- 34 -
Tabla 4: Análisis estadístico de viabilidad (%) 1 hora post mortem	- 43 -
Tabla 5: Análisis Estadístico de Viabilidad (%) a 3 horas post mortem	- 44 -
Tabla 6: Análisis Estadístico de Viabilidad (%) a 5 horas post mortem	- 45 -
Tabla 7: Análisis Estadístico de Viabilidad (%) a 7 horas post mortem	- 46 -
Tabla 8: Análisis Estadístico de Viabilidad (%) a 9 horas post mortem	- 47 -
Tabla 9: Viabilidad (%) de ovocitos bovinos a 1, 3, 5, 7 y 9 horas post mortem - 48 -	
Tabla 10: Análisis de regresión lineal	- 49 -
Tabla 11: Coeficientes de Regresión y estadísticos asociados	- 49 -
Tabla 12: Cuadro de Análisis de la Varianza	- 50 -
Tabla 13: Prueba de Tukey.....	- 51 -
Tabla 14: Cantidad ovocitos recolectados a 1, 3, 5,7 y 9 horas post mortem-	52
-	

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Viabilidad de ovocitos bovinos a 1 hora después del sacrificio	- 43 -
Gráfico 2: Viabilidad de ovocitos a 3 horas después del sacrificio.....	- 44 -
Gráfico 3: Viabilidad de ovocitos a 5 horas post mortem	- 45 -
Gráfico 4: Viabilidad de ovocitos a 7 horas post mortem	- 46 -
Gráfico 5: Viabilidad de ovocitos a 9 horas post mortem	- 47 -

Gráfico 6: Porcentaje de viabilidad de ovocitos bovinos a través del tiempo	- 48 -
Gráfico 7: Regresión lineal de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos ..	- 49 -

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1: Ovario, Región cortical	- 16 -
Fotografía 2: Ovogénesis	- 18 -
Fotografía 3: Anatomía del Ovocito	- 20 -
Fotografía 5: Ovarios Bovinos Recolectados.....	- 35 -
Fotografía 6: Ovocitos bovinos recolectados.....	- 36 -
Fotografía 7: Extracción de líquido folicular	- 39 -
Fotografía 8: Conteo de Ovocitos	- 39 -
Fotografía 9: Clasificación morfológica.....	- 40 -

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Cantidad de ovocitos obtenidos 1 hora post mortem.....	- 58 -
Anexo 2: Cantidad de ovocitos obtenidos 2 horas post mortem.....	- 59 -
Anexo 3: Cantidad de ovocitos obtenidos 5 horas post mortem.....	- 60 -
Anexo 4: Cantidad de ovocitos obtenidos 7 horas post mortem.....	- 61 -
Anexo 5: Cantidad de ovocitos obtenidos 9 horas post mortem.....	- 63 -

RESUMEN EJECUTIVO

Para determinar el porcentaje de viabilidad de ovocitos bovinos recolectados post mortem en el Camal Municipal de Tulcán a periodos de tiempo 1, 3, 5, 7 y 9 horas después del sacrificio de la hembra bovina. Se utilizaron (200) doscientos ovarios, los cuales fueron divididos en grupos de 40 por tratamiento y transportados al laboratorio en solución salina al 0,9% y a 38° C inmediatamente después de su recolección, enseguida fueron mantenidos a esa misma temperatura a baño maría, y se dejó transcurrir el tiempo especificado para cada tratamiento, para luego extraer los ovocitos mediante la técnica de "Slicing". Se realizó el conteo total de ovocitos por ovario y el conteo de ovocitos viables y no viables, para determinar el porcentaje de viabilidad. Para realizar el análisis de los datos, se usó estadística descriptiva, determinando medidas de tendencia central, análisis de regresión lineal, análisis de varianza y prueba de tukey.

La cantidad total de ovocitos viables fue de 2018, obteniendo un promedio de 10,09 ovocitos/ovario. Se observó una influencia negativa del tiempo en el porcentaje de viabilidad de los ovocitos donde el mayor porcentaje de ovocitos viables se obtuvo a 1 y 3 horas post mortem, con un valor de 68,7 % y 62,81 % de viabilidad, siendo los mejores momentos estadísticamente, sin embargo, se pudo obtener ovocitos viables aún transcurridas 9 horas después del sacrificio del animal manteniendo los ovarios a 38°C con un porcentaje de viabilidad de 51,51%, que se considera alto.

Palabras claves: Ovarios, ovocitos, porcentaje de viabilidad, tiempo de viabilidad.

ABSTRACT.

To determine the percentage of viability of bovine oocytes collected post mortem at the Municipal Slaughterhouse of Tulcán at time periods 1, 3, 5, 7 and 9 hours post slaughter of female cattle, two hundred ovaries, which were divided into 40 treatment groups and transported to the laboratory in 0.9% of saline solution and 38°C immediately after collection were used, then were kept at the same temperature in a water bath and was allowed to elapse specified for each treatment, and then extract the oocytes by time Slicing technique. The total count of oocytes per ovary and counting of viable and non-viable oocytes were used to determine percent of viability. For data analysis, descriptive statistics were used, determining measures of central tendency, linear regression analysis, analysis of variance and Tukey test.

The total number of viable oocytes was 2018, giving an average of 10.09 oocytes / ovary. The highest percentage of viable oocytes are obtained at 1 and 3 hours post slaughter, with a value of 68,7% and 62,81% of viability respectively, these were statistically the best times, but also viable oocytes could obtain yet elapsed nine hours post slaughter keeping ovaries at 38°C with a percentage viability of 51.51%.

Keywords: Ovaries, oocytes, percentage of viability, feasibility period.

TUKUYSHUK RANAKU

Kayun japingabu shuk yuyay yu tukuchingabu yuyan tukuchiran ashka yuyayta ñanta katingabu villikunata japishkamanta post mortem chay ukupi wañuchin Municipal de Tulcán pachamantapi 1, 3, 5, 7 y 9 pachakunata chaimanta wañuchin warmi billi. Mawkaran (200) ishkey patsak billikuna, kaykuna kutishuk ladukuna rrirran ashkay tandanakuran 40 katingabu japiran y aparán ukumu sanayachun allichingabu 0,9% y a 38°C ukta chaymanta japiran, uktamanta kay makita mañachiran chay pachalavili armaran maría, pachata sakilaran alli rrikush kayun katingabu, chaymanta surcungabu chaupimanta “Slicing”. Kay rrrraran cuentesh illita ovocitos uku ovario y kay cuentish ovocitos kutishuk rrin y na ashka garan, kaymanta alli yuyay tukuchingabu, y rrikungabu mashna gashka. Kayun alli yuyangabu rimayta ña nishka, mawkaran rimayta rrikungabu, alli rrikush chaupimanta chaypi gajunchu, yuyangabu kutin rrayarachun, yuyangabu tapungabu tukey.

Illita ovocitos rrirran garan 2018, charish shuk ña nishka 10,09 ovocitos/ovario. Kayta rrikuchiran y rrikuran allita na apun pachamanta ashkamanta viabilidad de los ovocitos maymanta ashka ovocitos ashka yuyaykuna chariran 1 y 3 pachamanta post mortem, kayun apangabu de 68,7 % y 62,81 % kutishk ladumu rrin, kay alli gash y kuila gan apajun, kay yuyaymanta, kayun chariran ovocitos na chayaran ña taktiran 9 pachapi, ña wañachishkamanta wiwa kayta charish ovarios 38°C ashka rrikuchin 51,51%, jatun kuyachun.

Jatun rimay: Ovarios, ovocitos, ashka jatun yuyay kutishuk ladumun rrin, pacha kutishuk ladu rrin.

INTRODUCCIÓN

La biotecnología de la reproducción incluye a las técnicas, desde la inseminación artificial (IA) hasta la clonación, o al conjunto de ellas, las que permiten aumentar la eficiencia reproductiva de los animales (Palma, 2001). Además, representa un desenvolvimiento socio económico para aquellos que se dedican a la actividad pecuaria y contribuye también en el aumento de alimentos de calidad para la población (Collantes, 2011).

La producción de embriones in vitro, tiene gran potencial en la actualidad ya que con ella podemos obtener un gran número de embriones utilizables para preservar e incluso mejorar poblaciones de animales consiguiendo un alto valor genético. Para el desarrollo de esa técnica se efectúan cuatro etapas: obtención de ovocitos, maduración de ovocitos, fecundación y cultivo de embriones. Una de las posibilidades de mejora podría ser la obtención de ovocitos mediante la selección del material biológico con mejores características para ser usadas en ellas. Por esto en los últimos años se ha investigado y se ha comprobado la gran importancia de la calidad ovocitaria para poder estimar el desarrollo de los embriones (Cuadrado, 2012).

Salgado, Simanca, & Vergara, (2013) afirman que el desarrollo embrionario depende de la competencia del ovocito, que involucra cambios morfológicos, estructurales, transcripcionales del citoplasma y compartimiento nuclear de los ovocitos. Siendo un punto crítico de estudio la obtención de la mayor cantidad posible de ovocitos viables que permitan un óptimo desenvolvimiento de las demás etapas para el desarrollo in vitro del embrión.

I. EL PROBLEMA.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los últimos años, la biotecnología ha hecho progresos sustanciales en las áreas de cría, reproducción y genética molecular de animales bovinos. Entre las técnicas de reproducción, la inseminación artificial (IA), y la ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET) han tenido un impacto significativo en los programas de cría de ganado en los países desarrollados. Sin embargo, la disponibilidad de estas tecnologías varía mucho entre países y regiones. La capacidad es generalmente más reducida en países en desarrollo que en regiones como Europa y América del Norte. (FAO, 2007)

En el Ecuador, históricamente el sector agropecuario ha desempeñado un rol protagónico en el desarrollo del país, esto debido sobre todo a las condiciones agrometeorológicas que posee, con animales resistentes y adaptados a diferentes pisos climáticos. Por lo tanto el material genético bovino que tiene es variado y podría ser utilizado en procesos biotecnológicos de conservación y mejoramiento genético. No obstante, el desarrollo de biotecnología reproductiva ha estado reducido de manera limitante, esto en parte, debido al escaso o nulo conocimiento que la población ecuatoriana tiene acerca de la importancia de conservar biotipos de especies ganaderas y las pocas investigaciones realizadas en este ámbito.

La provincia del Carchi a pesar de ser un sector ganadero cuenta con conocimientos muy básicos, aunque se está empezando a investigar sobre la biotecnología reproductiva, quedando únicamente relegada a la aplicación de inseminación artificial en algunas unidades de producción agropecuaria, dejando de lado técnicas más avanzadas como la ovulación múltiple y transferencia de

embriones que según la FAO (2010) han tenido un impacto notable en los programas de mejoramiento de ganado en los países desarrollados.

Los ganaderos siempre buscan conseguir hembras bovinas de alto valor genético, sin embargo, la descendencia de las mismas se ve limitada durante la vida reproductiva del animal. Son pocos los conocimientos en nuestro medio acerca de la obtención y conservación de ovocitos, los cuales pueden ser una opción de aprovechamiento genético después de la muerte de una hembra bovina con un potencial genético considerable.

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 (Velarde, 2005).

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

La necesidad de un mejoramiento del sector ganadero en nuestro medio y falta de investigaciones sobre técnicas de biotecnología reproductiva, nos llevan a proponer el siguiente problema de investigación: ¿Es posible obtener ovocitos bovinos viables post mortem a varios periodos de tiempo del camal Municipal de Tulcán?

1.3. DELIMITACIÓN.

1.3.1 Campo: Pecuario

1.3.2 Área: Biotecnología Agropecuaria

1.3.3 Características agroecológicas

1.3.3.1 Ubicación:

El presente proyecto se realizó en el Camal Municipal de Tulcán, Parroquia Tulcán, Cantón Tulcán, Provincia del Carchi, de donde se obtuvo las muestras de ovarios de hembras bovinas faenadas, de los cuales se extrajeron los ovocitos que fueron llevados al laboratorio de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi en donde se determinó su viabilidad en el lapso de tiempo de 1, 3, 5, 7 y 9 horas post mortem.

Tabla 1 Características de la Ubicación.

Provincia	Carchi
Cantón	Tulcán
Parroquia	Tulcán
Sitio	UPEC
Altitud	2938 m.s.n.m.
Latitud	0° 48' 0" N
Longitud	77° 43' 0" E
Temperatura promedio mensual	13.2 °C
Precipitación promedio mensual	75.1 mm
Humedad relativa	79 %

Fuente: Estación aeropuerto de Tulcán-2011

Elaborado por: Sierra, K. (2014)

1.3.4. Duración de la investigación.

La presente investigación tuvo una duración de 6 meses.

1.3.5. Beneficiarios

Con la utilización de los ovocitos obtenidos post mortem se trata de beneficiar al sector pecuario al dar un aprovechamiento del material genético de hembras bovinas para ser utilizado en la técnica de fecundación in vitro lo que permite en casos de muerte súbita de un animal de alto valor genético, utilizar sus células reproductivas para asegurar su descendencia.

1.3.6. Fuentes de información

Este proyecto se lo realizo mediante fuentes de informaciones secundarias tales como: fuentes bibliográficas e internet, revistas, libros, artículos científicos, datos estadísticos, entre otros como se plasma en el Capítulo V.

1.4. JUSTIFICACIÓN.

La presente investigación se justifica por la importancia que tiene el desarrollo de la biotecnología reproductiva que incrementa la eficiencia reproductiva de los animales y representa un desarrollo socio económico para aquellos que se dedican a esta actividad, además contribuye al aumento de alimentos de calidad para la población, por lo que se la considera un elemento vital para satisfacer el incremento de la demanda de productos procedentes del ganado.

Estas tecnologías permiten además, acelerar el progreso genético, reducir el riesgo de transmisión de enfermedades y aumentar el número de animales que pueden ser criados. (FAO, 2007). Su implementación, uso y masificación debe

apuntar a un país que exporte y venda tecnologías a partir de la gran diversidad genética que posee el Ecuador con animales resistentes y adaptados a diferentes pisos climáticos como aquel ganado de lechería que se explota sobre los 3.000 msnm (Caiza, 2013).

Según Collantes (2011), afirma que existe un riesgo muy grande al adquirir un ejemplar bovino de alto valor genético, ya que existen enfermedades, sustancias tóxicas, y una serie de factores que podrían causar una muerte súbita del animal, o simplemente atrofiar su capacidad reproductiva. Considerando estos riesgos, es necesario estar al tanto del avance de las biotecnologías aplicadas a la reproducción bovina, ya que ellas nos brindan alternativas para un eficiente aprovechamiento del potencial genético de un reproductor, sea macho o hembra, además nos ofrece soluciones reales para casos como incapacidad de reproducción por alguna enfermedad, o en el caso de una muerte súbita que se pueda presentar en la hacienda.

Esta investigación pretende dar una alternativa de aprovechamiento de ovarios bovinos post mortem, ofreciendo la posibilidad de convertir a la hembra en productora de gametos sin importar la edad o estado fisiológico, equiparándola con los machos productores de semen, incrementando significativamente la posibilidad de producción de embriones in vitro.

Salgado, Simanca, & Vergara, (2013) afirman que el desarrollo embrionario in vitro, depende de la competencia del ovocito, la cual involucra cambios morfológicos, estructurales, transcripcionales del citoplasma y compartimiento nuclear de los ovocitos. Siendo un punto crítico de estudio la obtención de la mayor cantidad posible de ovocitos viables que permitan un óptimo desenvolvimiento de las demás etapas para el desarrollo in vitro del embrión. Es

por ello que con esta investigación se pretende demostrar la posibilidad de obtener ovocitos bovinos viables después de la pérdida del animal recuperando parte de su material genético, que caso contrario serían desaprovechados tras su muerte.

El desarrollo de esta investigación marca una pauta para la aplicación de la biotecnología en nuestro medio, que si bien es cierto, se ha empezado por técnicas como la inseminación artificial, queda mucho por investigar en este ámbito, de gran importancia para el mejoramiento del sector pecuario de nuestro país.

1.5. OBJETIVOS.

1.5.1. Objetivo General.

- ✓ Determinar la viabilidad de los ovocitos bovinos obtenidos post mortem a varios periodos de tiempo en el camal municipal de Tulcán.

1.5.2. Objetivos Específicos.

- ✓ Fundamentar bibliográficamente la obtención post mortem de ovocitos viables.
- ✓ Determinar morfológicamente la viabilidad ovocitos bovinos obtenidos post mortem en el Camal Municipal de Tulcán
- ✓ Determinar la cantidad de ovocitos viables obtenidos post mortem.
- ✓ Definir el tiempo óptimo para conseguir el mayor número de ovocitos viables post mortem.

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.

Después de haber realizado la búsqueda de las fuentes de información secundarias respecto al tema, se ha descubierto que existe en nuestro país poca información sobre las variables, sin embargo se han encontrado las siguientes investigaciones:

Collantes (2011) en su investigación “Tiempo de viabilidad de los Ovocitos bovinos recuperados en el Camal de Santa Cruz – Galápagos, en condiciones similares a la de nuestras haciendas”, se ejecutó la evaluación del tiempo de viabilidad de ovocitos bovinos con cinco tratamientos de 1, 3, 6, 9, 12 horas después de haber recuperado los ovarios del matadero, y un tratamiento control, inmediatamente después de recuperar los ovarios, bajo un análisis estadístico, se pudo demostrar que aún 12 horas después de la muerte de una hembra bovino, se pueden conservar los ovarios a temperaturas de 23 – 30 °C, en solución salina al 0.9%, y recuperar en algunos casos una cantidad considerable de estructuras morfológicamente viables para ser enviadas a un laboratorio especializado donde podrán ser utilizados para la producción in vitro de embriones (PIV). Se consiguió un porcentaje total de 44% de ovocitos morfológicamente viables, y de un 25% de viabilidad en estructuras 12 horas después del sacrificio, sin embargo afirma que se puede obtener una mayor cantidad de ovocitos viables, si los mantenemos a temperatura estable (35 – 37 °C), con antibióticos para prevenir la proliferación de bacterias, entre otros factores se podría tener un rango de posibilidades mucho mayor en cuanto a tiempo de recuperación post-mortem, y porcentaje de ovocitos viables recuperados.

Fernández F., Hernández E. & Castellanos G. (2012) en su investigación publicada en la Revista Salud Animal titulada “Viabilidad de Ovocitos Porcinos Inmaduros y Madurados In Vitro Vitricados con Etilén Glicol y Trehalosa”, se evalúa la viabilidad de ovocitos porcinos inmaduros (VG) y madurados in vitro (MII) después de la vitricación usando etilén glicol y trehalosa, se colectaron 503 ovarios de los cuales se obtuvieron 731 ovocitos por aspiración de folículos de 3 a 5 mm. Estos se dividieron en 3 grupos: Grupo 1) control (52 ovocitos), Grupo 2) vitricación de ovocitos en estado de VG (326 ovocitos) y maduración después del calentamiento y Grupo 3) vitricación de ovocitos madurados in vitro (353 ovocitos). En el grupo 1, después de ser cultivados in vitro por 44 horas se evaluó la maduración mediante la tinción con orceína al 1% en ácido acético al 45%. Los grupos 2 y 3 fueron vitricados utilizando el protocolo de dos pasos (equilibrio y vitricación), la viabilidad fue evaluada al momento del calentamiento (desvitricación), mediante la tinción con azul de tiazolil (MTT). Los resultados obtenidos de maduración en el grupo 1, fue con presencia de VG 44%, en estado de MI (cromatina condensada o metafase I) 23% y MII 33%. La viabilidad en el grupo 2, en fresco fue 100%, al momento del calentamiento 76% y a 44 horas de cultivo in vitro después del calentamiento 13%. Los ovocitos del grupo 3, antes de la vitricación presentaron una viabilidad de 94.8% y después del calentamiento 50%. Se concluye que aunque la viabilidad es mayor al momento del calentamiento en los ovocitos inmaduros que en los maduros, éstos últimos pueden presentar una mayor ventaja para el desarrollo posterior en la reproducción asistida, ya que en los inmaduros reduce mucho la viabilidad al cultivarlos por 44 horas para su maduración in vitro.

Valencia (2012) en su tesis “Maduración in vitro de ovocitos colectados post mortem de ovarios de vacas Holstein Friesian y Jersey” propone desarrollar la técnica de Maduración in vitro (MIV) de ovocitos de dos razas bovinas destinadas a matadero, y evaluar el efecto de la suplementación del medio TCM-199 con Suero Fetal Bovino (SFB) o Epidermal Growth Factor (EGF) y dos métodos de

evaluación de la MIV: expansión de cummulus (EC) y aparición del primer corpúsculo polar (CP). En esta investigación se trabajó con un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x2 (4 tratamientos). Los ovarios bovinos fueron recuperados del matadero del cantón Mejía. La MIV se hizo a 37°C, 5% de CO2 y humedad a saturación por 22-24h. Se pusieron a madurar 80 ovocitos, 40 pertenecientes a la raza Holstein Friesian y 40 a la raza Jersey. De los cuales maduraron 55 (68.75%) evaluados por EC y 59 (73.5%) evaluados por CP. La tasa de maduración para el medio TCM-199 +SFB fue de 62.5% para EC y 72.2% para CP, y para el medio TCM-199+EGF fue de 75% para EC y 75% para CP. La tasa de maduración para Holstein fue de 65% para EC y 80% para CP y para Jersey 72% (EC) y 67% (CP). Los ANOVA mostraron que no existen diferencias significativas entre tratamientos, medios ni razas. Este trabajo representa el primer intento de MIV en el Ecuador, cuyos resultados son similares a los reportados en otros trabajos, a pesar de haber trabajado a un grado y medio menos de temperatura. Esto abre las puertas para continuar con estudios de fertilización in vitro y criopreservación en bovinos, permitiéndonos estar a la par con respecto a los países de la región.

2.2. FUNDAMENTACIÓN LEGAL

Constitución de la República del Ecuador año 2008.

Art. 14 Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*.

Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.

Art. 281 La soberanía alimentaria constituye un objetivo estratégico y una obligación del Estado para garantizar que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades alcancen la autosuficiencia de alimentos sanos y culturalmente apropiados de forma permanente (Asamblea Constituyente, 2008).

Para ello, será responsabilidad del Estado:

En el **Art. 281, inciso 7**. Precautelar que los animales destinados a la alimentación humana estén sanos y sean criados en un entorno saludable.

En el **Art. 281, inciso 8**. Asegurar el desarrollo de la investigación científica y de la innovación tecnológica apropiada para garantizar la soberanía alimentaria.

En el **Art. 281, inciso 13**. Prevenir y proteger a la población del consumo de alimentos contaminados o que pongan en riesgo su salud o que la ciencia tenga incertidumbre sobre sus efectos. (Asamblea Constituyente, 2008)

La presente investigación busca aportar con plenitud a la seguridad alimentaria y dar cumplimiento a los objetivos 7 y 8 del Plan Nacional del Buen Vivir 2013-2017 que mencionan “GARANTIZAR LOS DERECHOS DE LA NATURALEZA Y PROMOVER LA SOSTENIBILIDAD AMBIENTAL TERRITORIAL Y GLOBAL” “CONSOLIDAR EL SISTEMA ECONÓMICO SOCIAL Y SOLIDARIO, DE FORMA SOSTENIBLE” por lo que la presente investigación da cumplimiento a estos objetivos ya que la provincia del Carchi al ser una provincia netamente agropecuaria.

Con la presente investigación pretendemos dar cumplimiento a lo estipulado en el reglamento de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi en cuanto a trabajos de investigación de tesis, graduación, titulación e incorporación, capítulo II del marco legal, artículo 2 que menciona la obligatoriedad de la tesis, para la obtención del título profesional de tercer nivel, en referencia a los artículos 80 literal e) y 144 de la ley orgánica de educación superior – LOES. (UPEC, 2011).

2.3. FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA.

Económicamente nuestro país, más específicamente nuestra provincia es un sector ganadero, en donde la principal fuente de ingresos de la población es la crianza de ganado lechero. El desarrollo de técnicas de mejoramiento reproductivo de estos animales, es de trascendencia para incrementar la producción y mejorar la genética, lo que permite el crecimiento de la economía de la región.

En cuanto al aspecto social, los ganaderos buscan la optimización de recursos que poseen para mejorar la producción de leche y carne, lo cual se consigue con animales de alto valor genético, sin embargo, su tiempo de vida y capacidades reproductivas son limitadas. Con esta investigación se planea un incremento de la conservación y propagación de material genético, obteniendo ovocitos aun tras la muerte del animal, aprovechando y generando una fuente de estudio para el desarrollo y mejoramiento de tecnologías que permitan conseguir animales que sean fuente de alimento para toda la población.

El medio ambiente es un recurso muy apreciado en la actualidad, sin embargo son muchos los desechos provenientes de camales que pueden ser aprovechados, como es el caso de los ovarios obtenidos post mortem, los cuales

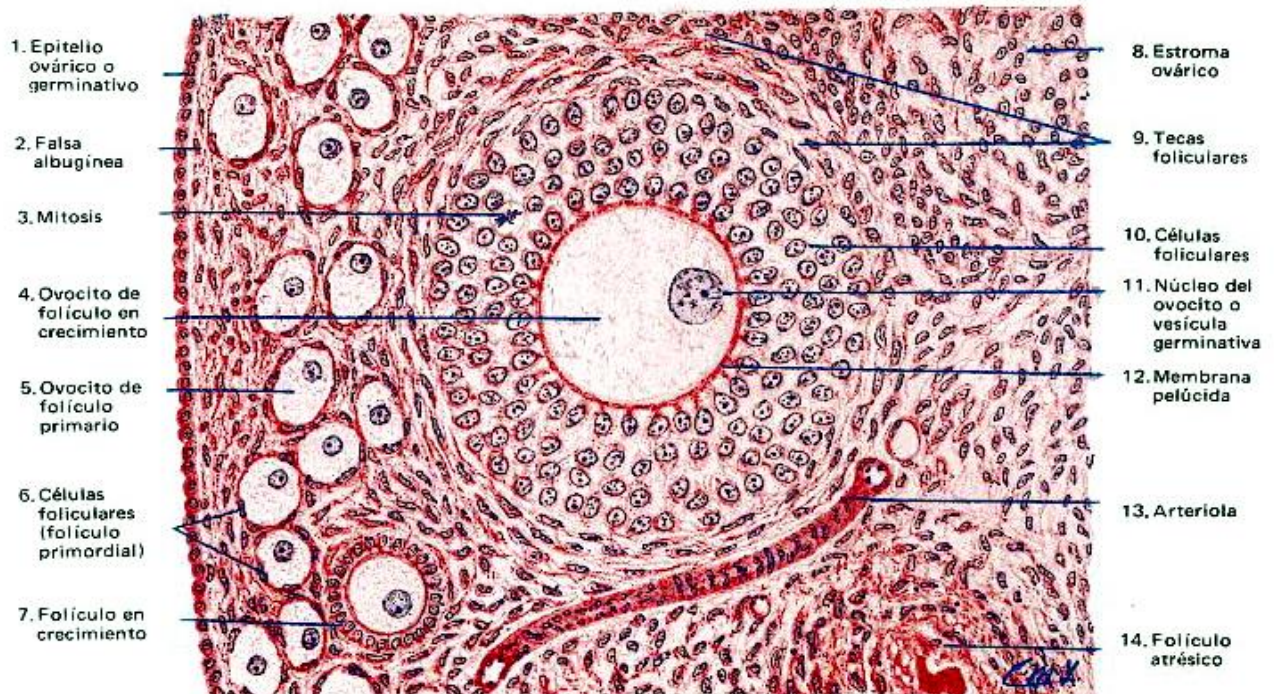
son fuente de una gran cantidad de ovocitos, que después de su maduración pueden estar aptos para la generación de embriones in vitro.

2.4. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA

2.4.1. Ciclo Ovárico

El ovario presenta una estructura medular muy vascularizada e innervada y otra periférica o cortical de color grisáceo, compuesta básicamente por los folículos ováricos y el tejido intersticial; la masa ovárica está cubierta por la túnica albugínea (tejido colágeno), y esta a su vez por una capa de células cúbicas (epitelio germinativo). (Capallejas et. al., 2009)

Fotografía 1: Ovario, Región cortical



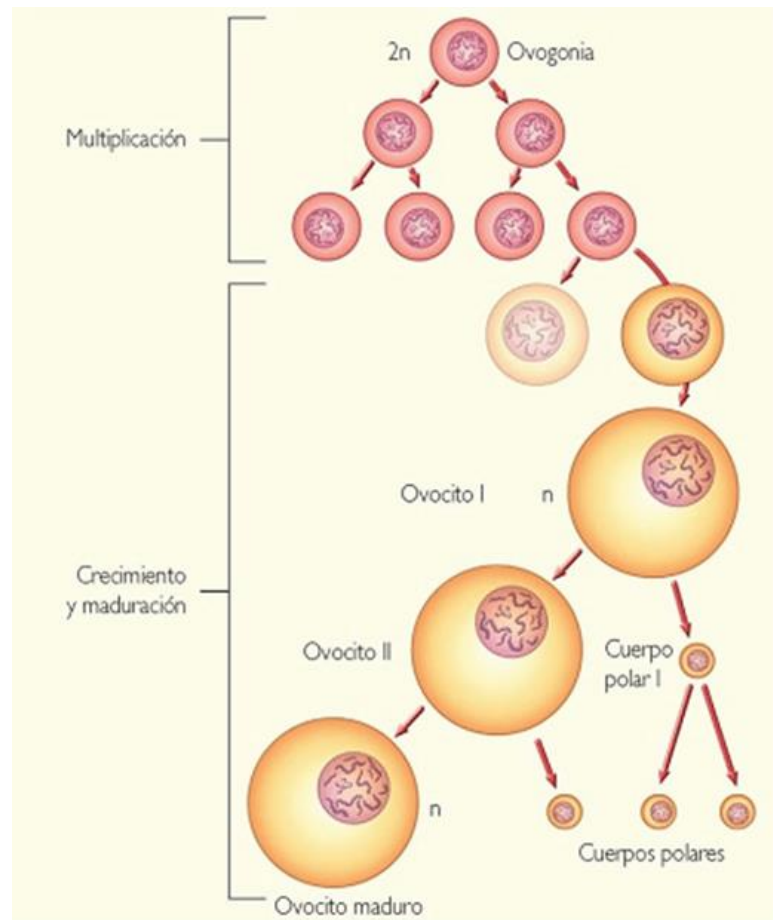
Fuente: Láminas Ovario (Universidad de Sevilla, 2014)

Esencialmente el curso de la actividad ovárica se encamina al desarrollo del óvulo y de las estructuras foliculares para culminar con la formación y la evolución del cuerpo lúteo, los cuales determinan una fase folicular o estrogénica y otra luteal o progesterónica. (Santa Cruz, 2012)

2.4.2. Ovogénesis

El número de gametos que poseen las hembras domésticas está fijado desde el mismo momento de su nacimiento. La ternera nace con un crecido número de ovocitos primarios, el que varía grandemente; se calcula de unos 40 000 a 800 000. Estos disminuyen muy rápido a partir del nacimiento y después de este lo hacen de forma gradual. (Brito & Tagle, 2009). La ovogénesis comienza en la vida fetal con la división mitótica de las ovogonias, hasta que en cierto momento las células se convierten en ovocitos y empiezan el proceso de meiosis, el cual permite obtener una célula haploide apta para ser fecundada (óvulo). “La meiosis se detiene en dos momentos específicos: alrededor del nacimiento y en la ovulación y sólo se completará al producirse la fecundación. El proceso meiótico consta de dos divisiones: meiosis I y II, divididas cada una en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase” (González, 2012).

Fotografía 2: Ovogénesis



Fuente: Gametogénesis, (Apuntes de Biología para estudiantes y Profesores, 2014)

2.4.3. Foliculogénesis

En definición, el folículo, es el compartimento que permite el desarrollo ovocitario, de tal manera que cumple dos funciones fundamentales: la producción de ovocitos fecundables y la secreción de hormonas que mantienen la gestación y aseguran la implantación y desarrollo exitoso del embrión en el útero (Herrera & Jara, 2009). La foliculogénesis es un proceso dinámico y rápido, que se produce durante el proestro y estro, y consiste en la formación de un folículo preovulatorio o de Graff a partir de un folículo primordial (Mellisho, 2010).

El folículo primordial está constituido por el ovocito primario, que se encuentra rodeado de una pequeña capa de pequeñas células foliculares planas, que dan origen a las células de la granulosa. Según (Palma, 2001) el inicio de su crecimiento se define por: el incremento en el tamaño del ovocito, un cambio en la forma de las células foliculares, que pasan de planas a cúbicas y el comienzo de la formación de la zona pelúcida, denominándose folículo primario.

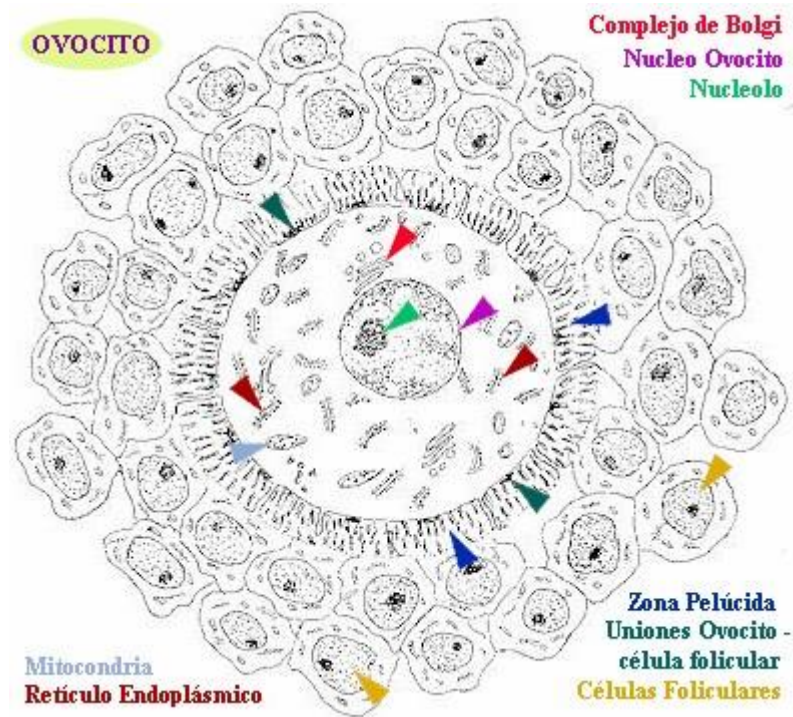
Los folículos secundarios se identifican por la multiplicación de las células cúbicas y la invasión de una red de capilares entre las células que rodean el folículo, aportando los nutrientes a la membrana granulosa y al ovocito. Posteriormente sucede la aparición del espacio folicular o antro folicular, el líquido presente en esta cavidad se denomina licor folicular; en este momento los folículos se denominan folículos terciarios. Por último sucede la aparición del folículo preovulatorio o De Graaf, que es un folículo terciario que está en capacidades de ovular.

Los folículos también pueden clasificarse en folículos preantrales (encontramos a folículos primordiales, primarios y secundarios) y folículos antrales (incluyen a los folículos terciarios y el folículo De Graaf).

2.4.4. Maduración del Ovocito

La maduración del ovocito supone el final de un largo proceso de diferenciación celular que comprende diversos cambios estructurales en el núcleo y citoplasma, así como cambios de naturaleza molecular (Caínzos, 2012).

Fotografía 3: Anatomía del Ovocito



Fuente: Ovocito (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, 2014)

La maduración puede ser dividida en dos etapas: un largo periodo inicial, durante el cual el ovocito crece y madura en el interior de un folículo en crecimiento, y un corto periodo final que se completa entre el reinicio de la meiosis y la ovulación. La primera de estas etapas tiene una duración de varias semanas o meses y supone la adquisición gradual de una gran parte de la maquinaria necesaria para soportar el desarrollo embrionario temprano (Eppig y Downs, citados por Caínzos, 2012).

El ovocito crecido aún alcanza la facultad de secretar las proteínas necesarias para la reactivación de la meiosis. Cuando el folículo antral alcanza un tamaño determinado (diámetro de 1,8 mm en la vaca), termina el crecimiento del ovocito (145-150 μm en vaca) y adquiere la capacidad de reanudar la meiosis (este hecho es conocido como “competencia” del oocito). (Benavides, 2012)

La maduración nuclear abarca la progresión desde el estado de la profase de la primera división meiótica hasta la metafase de la segunda división meiótica. La descarga de LH, originada pocas horas antes de la ovulación e inducida por el propio oocito, activa de nuevo la meiosis, que se aprecia por la desintegración de la vesícula germinal, ocurriendo las distintas fases meióticas, hasta que tras la extrusión del primer corpúsculo polar, se vuelve a interrumpir la meiosis en la metafase de la segunda división, coincidiendo con la ovulación (Benavides, 2012).

La maduración citoplásmica incluye una sucesión de transformaciones de los orgánulos del oocito, fundamentalmente de mitocondrias, gránulos corticales y retículo endoplásmico liso y rugoso, todas necesarias, para el desarrollo de la maduración y el bloqueo de la poliespermia. Thibault y Gerard citados por Lorenzo (1992) también señalan que se producen proteínas de nueva síntesis, como el factor del crecimiento del pronúcleo masculino (MPGF) y el factor promotor de la maduración (MPF).

Una vez que un folículo empieza a crecer, el crecimiento parece ser continuo hasta que el folículo tiene uno de dos posibles destinos ovulación o atresia. Es bien conocido que muy pocos folículos que inician su crecimiento exitosamente llegan a ovular, la mayoría muere antes de alcanzar este estadio (Benavides, 2012).

2.4.5. Biotecnología de la reproducción

El impetuoso avance de la biotecnología obliga a ampliar cada día más el contenido científico de la reproducción animal. “Comprende una serie de biotécnicas que están permitiendo aumentar la productividad y la tasa de

mejoramiento genético de los animales ampliando la eficiencia reproductiva y una calidad superior de sus productos” (Mellisho, 2010).

2.4.6. Técnica de la maduración ovocitaria

La técnica de maduración ovocitaria in vitro, proporciona la posibilidad de convertir a la hembra en productora de gametos, equiparándola cuantitativamente a los machos que producen semen para la inseminación artificial. Ya que los ovarios de los mamíferos contienen folículos que se hallan en diferentes estadios de desarrollo, de los cuales únicamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. Los ovocitos bovinos inmaduros permanecen en profase meiótica I en el interior de los folículos ováricos, pero cuando son removidos de éstos y cultivados in vitro bajo condiciones adecuadas, reanudan la meiosis espontáneamente y alcanzan la etapa de metafase II (Valencia, 2012).

Los ovocitos madurados, son empleados en la transferencia de embriones que constituye un método de obtención de óvulos fertilizados de una hembra donante y su transferencia al aparato reproductivo de otra hembra o receptora, de la misma especie, donde se desarrollará la gestación y se producirá el parto.

2.4.7. Obtención de ovarios post mortem

Los ovarios se consiguen de vacas o novillas en diferentes estados fisiológicos, sin tener en cuenta el ciclo estral del animal, dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales. Los ovarios se recogen y se colocan en un termo de transporte que contiene solución salina (0.9% NaCl), o solución fosfato-tamponada salina (PBS). Generalmente se añade a estas soluciones antibióticos como kanamicina, penicilina o gentamicina.

La temperatura de transporte según Palma citado por González (2012), puede ser temperatura ambiente, sin embargo, se ha demostrado que el mantenimiento de la temperatura durante el transporte a 30°C es importante ya que por debajo de esta, se ve comprometida la capacidad de maduración del ovocito in vitro (Santa Cruz, 2012).

Una vez se encuentren en el laboratorio los ovarios se lavan repetidamente en la solución de transporte. En seguida, los ovocitos pueden ser recogidos de inmediato, o bien, se colocan los ovarios en baño termostático a 38°C antes de proceder a la obtención de los ovocitos (González, 2012).

2.4.8. Selección del Folículo

Según Motlik y Fulka citados por Santa Cruz (2012), los folículos menores de 2 mm de diámetro contienen un alto porcentaje de ovocitos incompetentes o bien atrésicos, mientras que los mayores de 10 mm presentan un mayor número de ovocitos degenerados. Por ello, la mayoría de los autores seleccionan folículos antrales, de diámetros comprendidos entre 2 y 8 mm.

Gandolfi y cols. citados por Gardón (2000), afirman que la morfología de los ovarios puede ayudar como método de preselección de ovocitos, clasificando a los ovarios en tres categorías de acuerdo a la cantidad y tamaño de folículos. De esta manera: Categoría 1: ovarios con folículo mayor a 10 mm de diámetro. Categoría 2: ovarios con presencia de 10 folículos de 2 a 5 mm de diámetro y ausencia de 1 folículo de 10 mm de diámetro y Categoría 3: ovarios con presencia de menos de 10 folículos de 2 a 5 mm de diámetro y ausencia de 1 folículo de 10 mm de diámetro. Indicando que los ovarios de las categorías 1 y 2 contienen ovocitos que forman mayor proporción de blastositos, después de ser madurados y fertilizados in vitro.

2.4.9. Obtención de ovocitos

2.4.9.1. Tiempo de recolección

El tiempo que transcurre entre el sacrificio del animal y el inicio de la maduración de los ovocitos, así como la temperatura a la que se mantienen los ovarios durante este periodo son dos variables que afectan a los resultados finales. Diversos estudios revelan que existe una relación inversamente proporcional entre la duración del periodo desde el sacrificio del animal hasta la aspiración de los folículos y el porcentaje de blastocistos obtenido (Caínzos, 2012).

El tiempo que media entre la obtención de los ovarios, el transporte al laboratorio a 30°C y la obtención de los ovocitos puede variar entre 2 y 7 horas (Santa Cruz, 2012). Cuando se evalúa el efecto de la temperatura de almacenamiento de los ovarios desde su obtención hasta su procesado en el laboratorio, los resultados indican que temperatura a la que se mantienen debe superar los 35° C para que los ovocitos conserven su competencia (Caínzos, 2012).

2.4.9.2. Métodos de recolección

Los ovocitos pueden obtenerse mediante dos métodos: el método de aspiración y el método de corte.

- El más común es el método de aspiración folicular, mediante la punción y succión de los folículos ubicados en la superficie del ovario, se someten a este procedimiento, folículos superficiales visibles de 2-5 mm. de diámetro con jeringas de 5-10 CC. y aguja calibre 18G (Collantes, 2011), éste método rinde solamente un moderado número de ovocitos por ovario, y se ha encontrado que el promedio puede mejorar mediante la disección del

tejido para alcanzar folículos corticales más profundos; sin embargo, la disección consume más tiempo (Benavides, 2012).

- Otra técnica conocida con el nombre de slicing o de corte, consiste en realizar numerosos cortes longitudinales y transversales con una hoja de bisturí a lo largo de toda la superficie ovárica, esta actuación garantiza la ruptura de los folículos ováricos y permite la recolección de Complejo Cúmulo Ovocito (CCO) mediante el lavado del ovario (Caínzos, 2012).

El número total de ovocitos obtenidos por ovario, varía de acuerdo al método de recolección utilizado. Estudios comparativos realizados entre el método de corte y el método de aspiración obtienen un mayor número de ovocitos en promedio por el método de corte en comparación al método de aspiración. Del mismo modo, es superior la proporción de ovocitos considerados como aptos para ser cultivados in vitro, mediante la utilización del método de corte (Santa Cruz, 2012).

2.4.10. Selección de ovocitos

La apropiada selección de los ovocitos para su maduración in vitro es crucial para conseguir el éxito de la fertilización in vitro y el desarrollo embrionario. De las características morfológicas del ovocito a madurar dependerá que reinicie la meiosis y la maduración citoplasmática (Ahuka, Montiel, & Ponciano, 2013).

Existen diversos métodos para la clasificación morfológica de los ovocitos. Es muy utilizada la clasificación de Stojkovic et al., citada por Collantes (2011), la cual se describe a continuación:

- Calidad 1: Ovocito con citoplasma homogéneo y con granulaciones finas, y múltiples capas compactas de células del cúmulo.
- Calidad 2: Ovocito con citoplasma homogéneo con pequeñas áreas que muestran pigmentaciones irregulares, cúmulo compacto menor que el de categoría uno, con no menos de 5 capas completas.
- Calidad 3: Ovocito con citoplasma completo/vacuolizado, la zona pelúcida cubierta con un mínimo de 3 capas de células del cúmulo y/o con pequeñas áreas desnudas.
- Calidad 4: Ovocito con citoplasma heterogéneo pigmentado y el cúmulo completa o parcialmente ausente o expandido.

Solamente los complejos ovocitos-cúmulo (COCs) clasificados como calidad 1 y 2 deben ser utilizados en la producción in vitro de embriones.

En resumen tenemos que los ovocitos calidad 1 y 2 son catalogados como viables para la producción in vitro de embriones, y los ovocitos de calidad 3 y 4 son catalogados como no viables para dicha biotecnología.

2.5. VOCABULARIO TÉCNICO

Anafase: es una fase de la mitosis y meiosis en la que los cromosomas se separan en una célula eucariota.

Atresia Folicular: proceso en el cual la mayor parte de los folículos para iniciar su desarrollo contenidos en el ovario degeneran antes de llegar a la etapa de folículo maduro.

COC: Complejo Cúmulos-Ovocito.

Células del Cumulus: células que rodean al ovocito tanto en el folículo ovárico como después de la ovulación.

Citoplasma: El citoplasma consiste en una estructura celular cuya apariencia es viscosa. Se encuentra localizada dentro de la membrana plasmática pero fuera del núcleo de la célula.

Gameto: Los gametos son las células sexuales haploides de los organismos pluricelulares originadas por meiosis.

Meiosis: Proceso de división celular, propio de las células reproductoras, en el que se reduce a la mitad el número de cromosomas.

Metafase: La Metafase es la fase de la mitosis y de la meiosis que sucede después de la profase en la que esta pierde la envoltura y aparecen los microtúbulos del huso acromático (también llamado meiótico) o mitótico.

Ovocitos: Célula germinal femenina que está en proceso de convertirse en un óvulo maduro. Para ello, será necesario que realice un complejo proceso de división celular llamado meiosis con la finalidad de reducir su dotación cromosómica a la mitad.

Profase: La Profase es la primera fase de la mitosis y de la meiosis. En ella se produce la condensación de todo el material genético (ADN)-que normalmente existe en forma de cromatina condensada dentro de una estructura altamente ordenada llamada cromosoma- y el desarrollo bipolar del huso acromático.

Telofase: Es la reversión de los procesos que tuvieron lugar durante la profase y prometafase. Es decir, todo vuelve al principio y se repite el proceso.

Transferencia de embriones: es un método artificial de reproducción que consiste en recoger un embrión del útero de una hembra llamada donante para introducirlo en el útero de una hembra llamada receptora. Así continuará su crecimiento y desarrollo hasta el parto.

2.6. HIPÓTESIS O IDEA A DEFENDER

2.6.1. Hipótesis afirmativa (H1)

Existe variación en la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem en relación con los periodos de tiempo de recolección.

2.6.2. Hipótesis nula (H₀)

No existe variación en la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem en relación con los periodos de tiempo de recolección

2.7. Variables de la Investigación

2.7.1. Variable Dependiente

Ovocitos bovinos viables

2.7.2. Variable Independiente

Tiempo transcurrido desde el sacrificio del animal hasta la obtención de ovocitos mediante "Slicing".

III. METODOLOGÍA.

3.1. MODALIDAD DE LA INVESTIGACIÓN.

La presente investigación tiene la modalidad de ser cuali-cuantitativa, porque se obtiene datos numéricos donde se evalúa variables durante todo el transcurso de la investigación como cantidad de ovocitos y porcentajes de viabilidad en función del tiempo en cada uno de los tratamientos, lo cual nos permite obtener resultados positivos o negativos en esta investigación.

3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN.

La presente investigación es de tipo exploratoria, ya que se empezó a explorar en investigar datos sobre la viabilidad de ovocitos de hembras bovinas faenadas en el Camal Municipal de Tulcán. La investigación proporcionó datos importantes que deben ser tomados en cuenta para generar acciones que permitan aprovechar el material genético de hembras bovinas post mortem.

También es una investigación de laboratorio ya que emplea muestras representativas en el laboratorio en un ambiente controlado y se utilizará un análisis estadístico como estrategia de control y metodología cuantitativa para analizar los datos. En esta investigación se analizarán cualidades morfológicas para determinar el mejor momento de recolección y se analizará cuantitativamente el porcentaje de ovocitos viables y no viables obtenidos.

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN.

3.3.1. Población:

La presente investigación toma como población cada unidad experimental obtenida en el Camal Municipal de Tulcán (ovarios bovinos), para ello se ha tomado el promedio mensual de hembras bovinas faenadas que es de 271 multiplicado por 3 que son los meses (agosto-octubre) durante los cuales se realizó el estudio y por 2 (cantidad de ovarios), dando un total de 1626 unidades.

3.3.2. Muestra:

La muestra se basa en los ovarios post mortem a los que se les realizarán los respectivos análisis.

Para el cálculo de la muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{k^2 * p * q * N}{(e^2 * (N-1)) + k^2 * p * q}$$

Donde:

N: es el tamaño de la población o universo

k: es una constante que depende del nivel de confianza que asignemos. Para un nivel de confianza de 95% el valor de k sería 1,96.

e: es el error muestral deseado para esta investigación es de 0.065%

p: es la proporción de individuos que poseen en la población la característica de estudio. Este dato es generalmente desconocido y se suele suponer que $p=q=0.5$ que es la opción más segura.

q: es la proporción de individuos que no poseen esa característica, es decir, es 1-p.

n: es el tamaño de la muestra.

$$n = \frac{1.96^2 * 0.5 * 0.5 * 1626}{(0.065^2(1625)) + 1.96^2 * 0.5 * 0.5}$$

$$n = \frac{1561,61}{6,87 + 0,96}$$

$$n = 200$$

Con esto obtenemos un total de 200 unidades experimentales que deberán ser analizados en esta investigación.

TABLA 2: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

HIPÓTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	ITEMS	TÉCNICAS	INSTRUMENTOS	INFORMANTE
Hi: Existe variación en la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem en relación con los periodos de tiempo recolección	Vd: Ovocitos bovinos viables	Cantidad	Porcentaje	%	Corte Observación	Microscopio, bisturí calculadora, conteo, registro.	Investigador
	Vi: Tiempo transcurrido desde el sacrificio del animal hasta la obtención de ovocitos mediante slicing	Tiempo	Horas post mortem	1, 3, 5, 7, 9	Observación	Cronómetro, reloj, control de tiempo.	Investigador

Elaborado por: Karolina Sierra

3.5. RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN.

3.5.1. Información bibliográfica.

En esta investigación se realizó una recolección de información necesaria referente al tema tratado a través de libros, artículos científicos, páginas web e investigaciones ya realizadas y observación de campo (Cap. V, Bibliografía).

3.5.2. Información procedimental.

Las variables en estudio se analizaron mediante análisis estadístico y análisis de regresión lineal en Infostat Versión Libre, en el cual los resultados permitieron comprobar las hipótesis planteadas.

3.5.3. Localización del experimento

La investigación se desarrolló en el Camal Municipal de Tulcán y en los laboratorios de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, ubicados en la parroquia de Tulcán, cantón Tulcán, provincia del Carchi.

3.5.4. Variables en estudio.

En la presente investigación “Determinación de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem a varios periodos de tiempo en el Camal Municipal de Tulcán”, las variables en estudio fueron; cantidad de ovocitos obtenidos y porcentajes de viabilidad.

3.5.4.1. Factores en estudio

El factor en estudio es el tiempo post mortem de recolección de ovocitos cuyos niveles son los momentos de recolección como se presenta en la tabla:

Tabla 3: Descripción de los factores en estudio.

Tiempo transcurrido post mortem	Ovarios №
1 hora	40
3 horas	40
5 horas	40
7 horas	40
9 horas	40

Elaborado por: Sierra (2014)

3.5.5. Análisis Estadístico

En esta investigación se realizó un análisis estadístico que consta de: medidas de tendencia central, análisis de regresión, análisis de varianza y prueba de Tukey para comparar los momentos de recolección.

3.5.6. Características de la muestra

Cada muestra estuvo constituida por un ovario de una hembra bovina sin tomar en cuenta su edad y estado fisiológico, los ovarios fueron obtenidos en el camal, fueron lavados, y colocados en una solución salina al 0.9% a una temperatura de 38°C.

Fotografía 4: Ovarios Bovinos Recolectados



Tomada por: Sierra, K. (2014)

3.5.7. Recolección de las muestras

La recolección de las muestras se realizó en el Camal municipal de Tulcán, las cuales fueron llevadas al laboratorio de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi para su observación.

3.5.8. Variables a evaluarse.

Las principales variables a evaluarse dentro de esta investigación fueron:

- a) Ovocitos obtenidos.
- b) Viabilidad (%) de los ovocitos obtenidos.

3.5.8.1. Cantidad de ovocitos obtenidos

La cantidad de ovocitos obtenida en cada ovario se determinó con la ayuda de un microscopio óptico, en donde se observó con el lente (40x), se realizó el conteo y registro.

Al completar el número total de muestras se sumó la cantidad de ovocitos obtenidos a las 1, 3, 5, 7 y 9 horas post mortem.

3.5.8.2. Porcentaje de viabilidad de ovocitos

Mediante observación directa a través de un microscopio óptico se realizó el conteo de los ovocitos obtenidos por ovario (ovocitos viables y no viables) y se determinó el porcentaje de viabilidad multiplicando el número de ovocitos viables por cien y dividiendo para el total de ovocitos obtenidos.

Fotografía 5: Ovocitos bovinos recolectados



Tomada por: Sierra, K. (2014)

3.5.9. Materiales

3.5.9.1. Materiales de campo

- Guantes quirúrgicos
- Overol
- Botas
- Bisturí
- Etiquetas
- Termos
- Hojas de registro

3.5.9.2. Materiales experimentales

- Ovarios
- Termo
- Tarrinas térmicas
- Bisturís
- Pinzas
- Guantes quirúrgicos
- Bolígrafo
- Hojas de registro

3.5.9.3. Equipos

- Microscopio
- Balanza de 300g de capacidad.
- Probeta de 1000 ml
- Termómetro
- Vidrio reloj
- Vaso de precipitación
- Baño María

- Flash Memori
- Calculadora
- Cámara fotográfica
- Computadora
- Impresora

3.5.9.4. Reactivos e insumos

- Solución salina
- Alcohol

3.5.10. Procedimiento

3.5.10.1. Obtención de ovarios: Antes de realizar el experimento, se adquirió todos los materiales y equipos necesarios para el desarrollo de la presente investigación. Durante 3 meses los ovarios se extrajeron de hembras bovinas en diferentes edades y estados fisiológicos sacrificadas en el Camal Municipal de Tulcán, ubicada en la Parroquia de Tulcán, cantón Tulcán, provincia del Carchi.

3.5.10.2. Obtención de ovocitos: Se utilizó el método de “slicing” o de corte para la obtención de ovocitos, ya que es el método con el que se obtiene una mayor cantidad. Para ello se colocó el ovario en un vidrio reloj, se le realizó cortes longitudinales y transversales y se lo enjuagó con solución salina al 0,9%. Posteriormente se realizó la decantación del líquido y se llevó al microscopio para la observación.

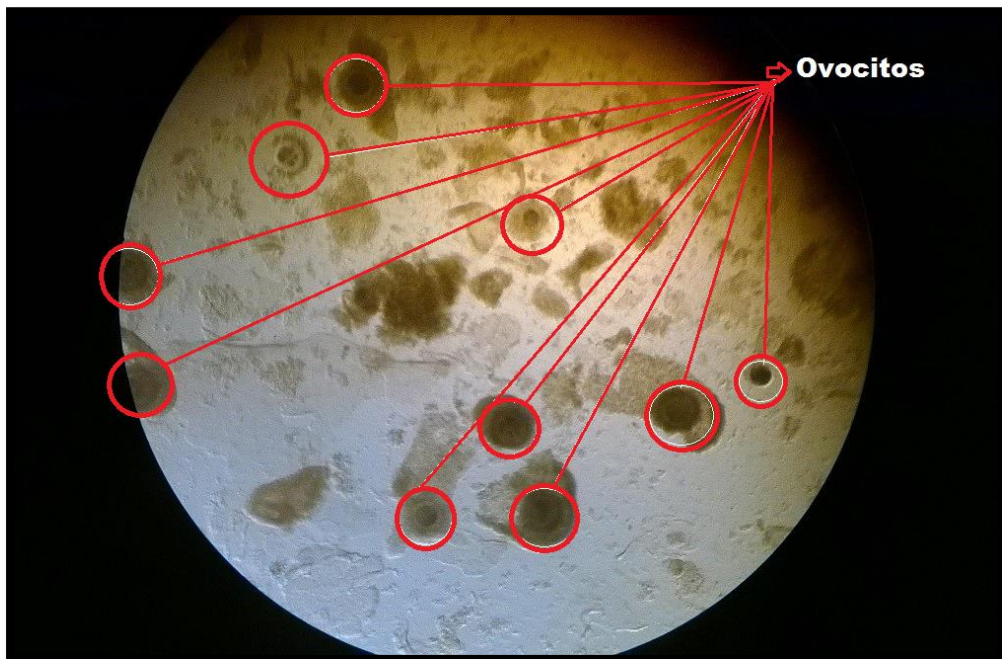
Fotografía 6: Extracción de líquido folicular



Tomada por: Sierra, K. (2014)

3.5.10.3. Conteo de ovocitos: Se realizó la recolección de información mediante la observación directa del contenido folicular mediante el microscopio, y se realizó el conteo de la cantidad de ovocitos procedente de cada ovario. Ver anexo 1, 2, 3, 4 y 5.

Fotografía 7: Conteo de Ovocitos

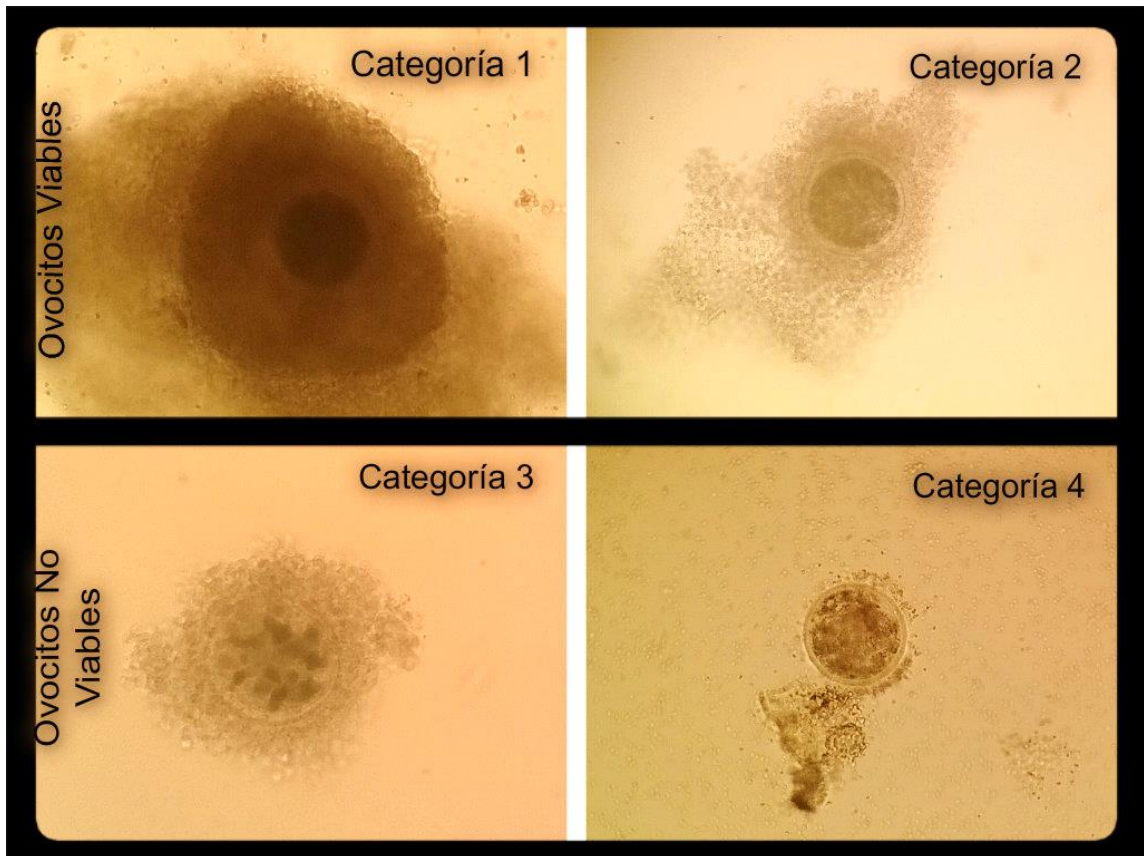


Tomada por: Sierra, K. (2014)

3.5.10.4. Clasificación de ovocitos: Con la utilización de un microscopio se observó los ovocitos presentes en el contenido folicular y se procedió a clasificarlos morfológicamente mediante la clasificación de Stojkovic et al., citada por Collantes (2011), en categorías 1, 2, 3 y 4, las cuales se describen en el apartado 2.4.10.

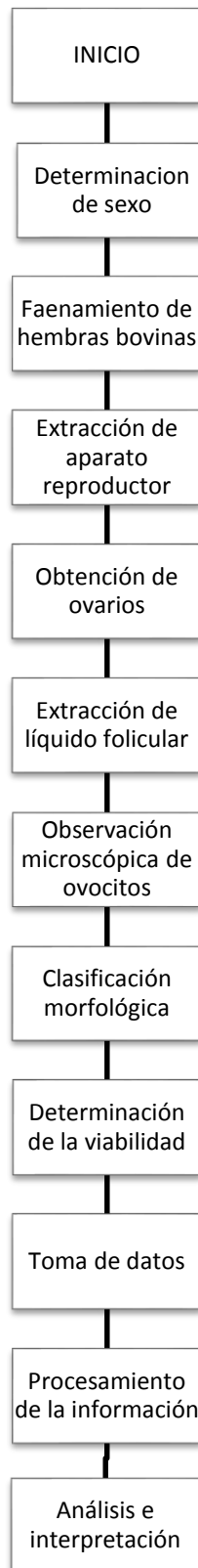
Tomando en cuenta que los ovocitos calidad 1 y 2 son catalogados como viables para la producción in vitro de embriones, y los ovocitos de calidad 3 y 4 son catalogados como no viables para dicha biotecnología.

Fotografía 8: Clasificación morfológica.



Tomada por: Sierra, K. (2014)

3.5.11. Diagrama de procedimiento



3.6. PROCESAMIENTO, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

3.6.1. Análisis de resultados.

Con los datos obtenidos en la investigación “Determinación de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem a varios periodos de tiempo en el Camal Municipal De Tulcán”, se procedió a realizar el análisis con el software estadístico de Infostat Versión Libre para evaluar factores, variables e hipótesis planteadas.

3.6.1.1. Análisis estadístico de variables.

Para realizar el análisis estadístico se evaluó: Medidas de tendencia central, análisis de regresión, análisis de varianza y prueba de Tukey para comparar los momentos de recolección a las 1, 3, 5, 7 y 9 horas después del sacrificio del animal.

a. Viabilidad (%) de ovocitos bovinos

Se registró la cantidad de ovocitos obtenidos en cada ovario, los cuales fueron clasificados morfológicamente en ovocitos viables y no viables de los cuales se obtuvo el porcentaje de viabilidad para cada tratamiento.

a.1. Viabilidad de ovocitos bovinos 1 hora post mortem

Al realizar el análisis estadístico del porcentaje de viabilidad de ovocitos bovinos se encontró un valor de $68,7 \pm 1,89$ % de viabilidad.

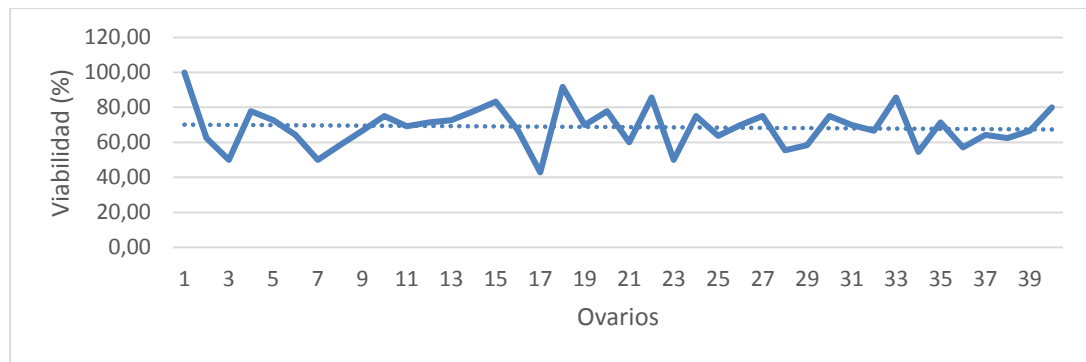
Tabla 4: Análisis estadístico de viabilidad (%) de ovocitos bovinos 1 hora post mortem

Media	68,70
Error típico	1,89
Mediana	69,61
Moda	66,67
Desviación estándar	11,94
Cuenta	40

Elaborado por: Sierra, K. (2014)

Al realizar el análisis estadístico se determina que existe un alto porcentaje de viabilidad ya que las medidas de tendencia central nos indican una viabilidad mayor a 66,67 %, lo cual es mayor que el porcentaje de viabilidad transcurrida 1 hora post mortem reportada por Collantes (2012), que reportó 55% de viabilidad. Los datos obtenidos en esta investigación se pueden observar en la siguiente gráfica:

Gráfico 1: Viabilidad de ovocitos bovinos a 1 hora post mortem



Elaborado por: Sierra, K. (2014)

a.2. Viabilidad (%) de ovocitos bovinos a 3 horas post mortem.

Al realizar el análisis estadístico del porcentaje de viabilidad de ovocitos bovinos a las 3 horas post mortem se encontró un valor de 62,81 ± 1,68 % de viabilidad.

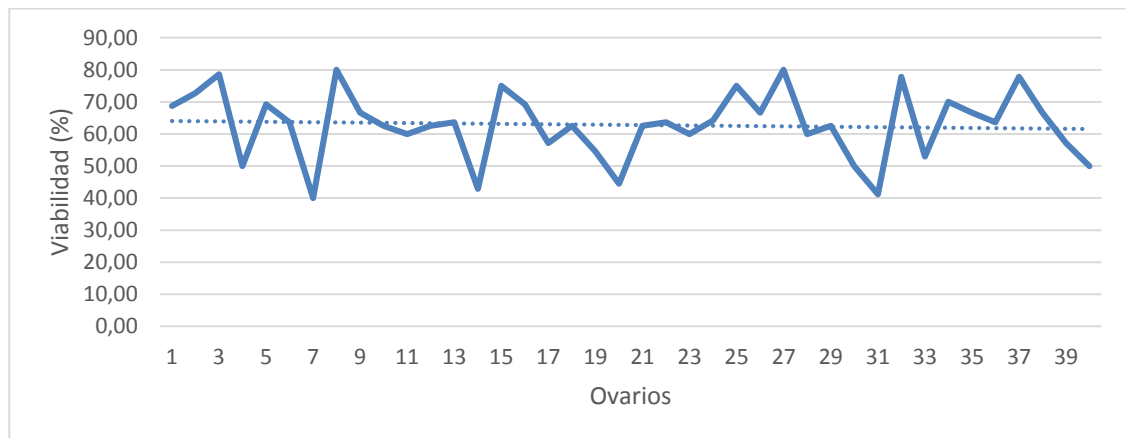
Tabla 5: Análisis Estadístico de Viabilidad (%) a 3 horas post mortem

Media	62,81
Error típico	1,68
Mediana	63,64
Moda	62,5
Desviación estándar	10,61
Cuenta	40

Elaborado por: Sierra, K. (2014)

Con el Análisis estadístico se determina que existe un alto porcentaje de viabilidad ya que es mayor a 62,5 %. Lo cual se puede observar en la siguiente gráfica:

Gráfico 2: Viabilidad de ovocitos a 3 horas después del sacrificio



Elaborado por Sierra. K. (2014)

a.3. Viabilidad (%) de ovocitos bovinos 5 horas post mortem.

Al realizar el análisis estadístico del porcentaje de viabilidad de ovocitos bovinos a las 5 horas post mortem se encontró un valor de $57,81 \pm 1,74$ % de viabilidad

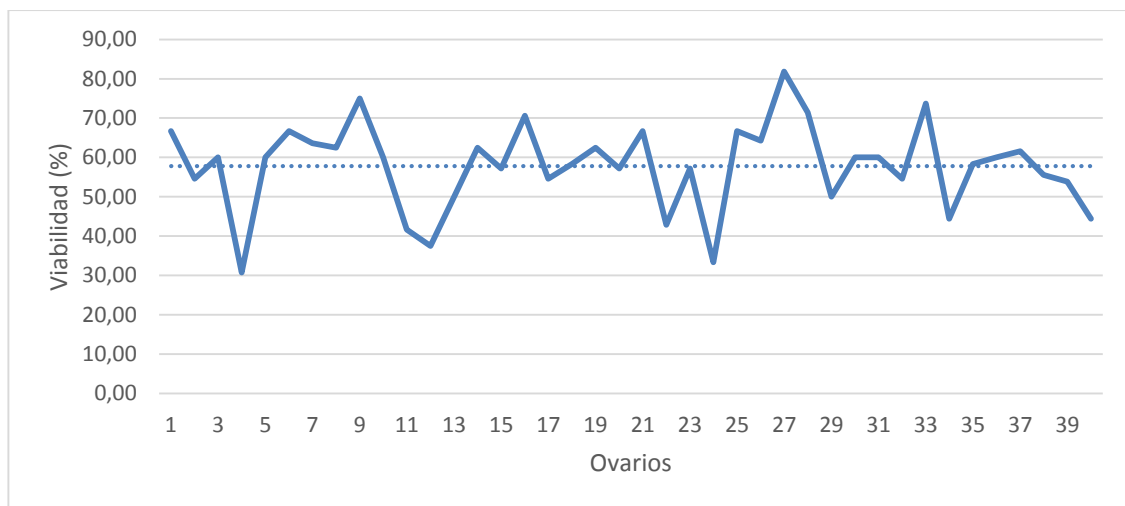
Tabla 6: Análisis Estadístico de Viabilidad (%) a 5 horas post mortem

Media	57,81
Error típico	1,74
Mediana	60
Moda	60
Desviación estándar	11,01
Cuenta	40

Elaborado por: Sierra, K. (2014)

Al realizar el Análisis estadístico se determina que existe un alto porcentaje de viabilidad ya que las medidas de tendencia central nos indican una viabilidad mayor a 57,81 %, lo cual se puede observar en la siguiente gráfica:

Gráfico 3: Viabilidad de ovocitos a 5 horas post mortem



Elaborado por: Sierra, K. (2014)

a.4. Porcentaje de Viabilidad a 7 horas post mortem.

Al realizar el análisis estadístico del porcentaje de viabilidad de ovocitos bovinos a las 3 horas post mortem se encontró un valor de $54,41 \pm 1,22$ % de viabilidad

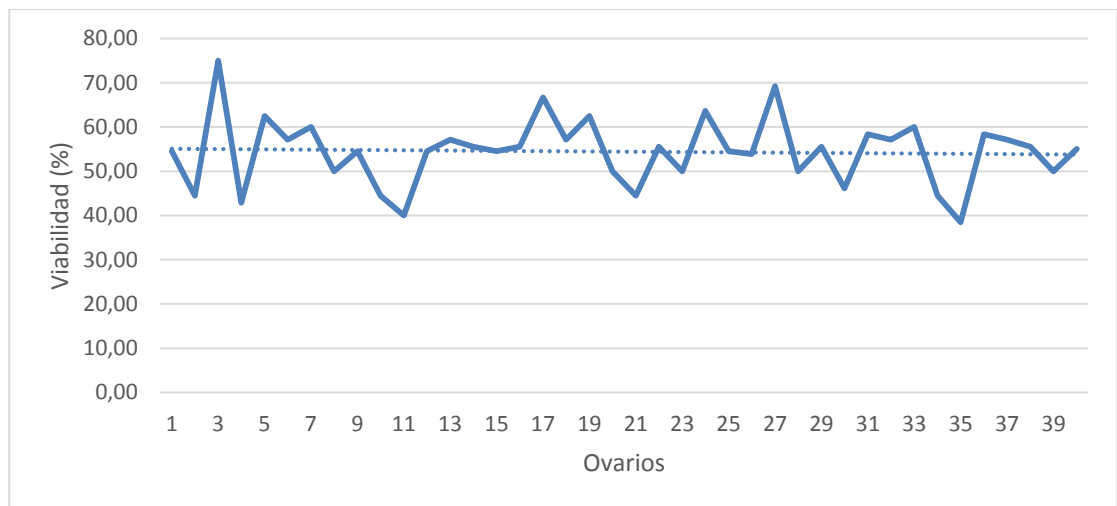
Tabla 7: Análisis Estadístico de Viabilidad (%) a 7 horas post mortem

Media	54,41
Error típico	1,22
Mediana	55,28
Moda	54,55
Desviación estándar	7,69
Cuenta	40

Elaborado por: Sierra, K. (2014)

Con el Análisis estadístico se determina que existe un alto porcentaje de viabilidad ya que las medidas de tendencia central nos indican una viabilidad mayor a 54,41%, lo cual se puede observar en la siguiente gráfica:

Gráfico 4: Viabilidad de ovocitos bovinos a 7 horas post mortem



Elaborado por: Sierra, K. (2014)

a.5. Viabilidad (%) de ovocitos bovinos 9 horas post mortem.

Al realizar el análisis estadístico del porcentaje de viabilidad de ovocitos bovinos a las 9 horas post mortem se encontró un valor de $51,51 \pm 1,32$ % de viabilidad

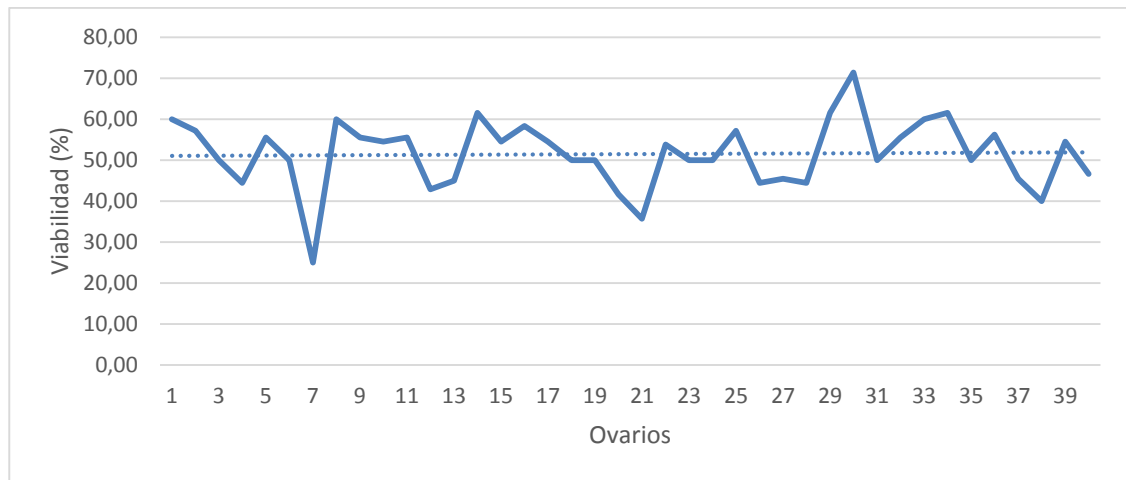
Tabla 8: Análisis Estadístico de Viabilidad (%) a 9 horas post mortem

Media	51,51
Error típico	1,32
Mediana	51,92
Moda	50
Desviación estándar	8,35
Cuenta	40

Elaborado por: Sierra, K. (2014)

Con el análisis estadístico se determina que existe un porcentaje medio de viabilidad ya que las medidas de tendencia central nos indican una viabilidad mayor a 50 %, lo cual se puede observar en la siguiente gráfica:

Gráfico 5: Viabilidad de ovocitos a 9 horas post mortem



Elaborado por: Sierra, K. (2014)

b. Viabilidad (%) de ovocitos bovinos en función del tiempo (1,3,5,7,9 horas)

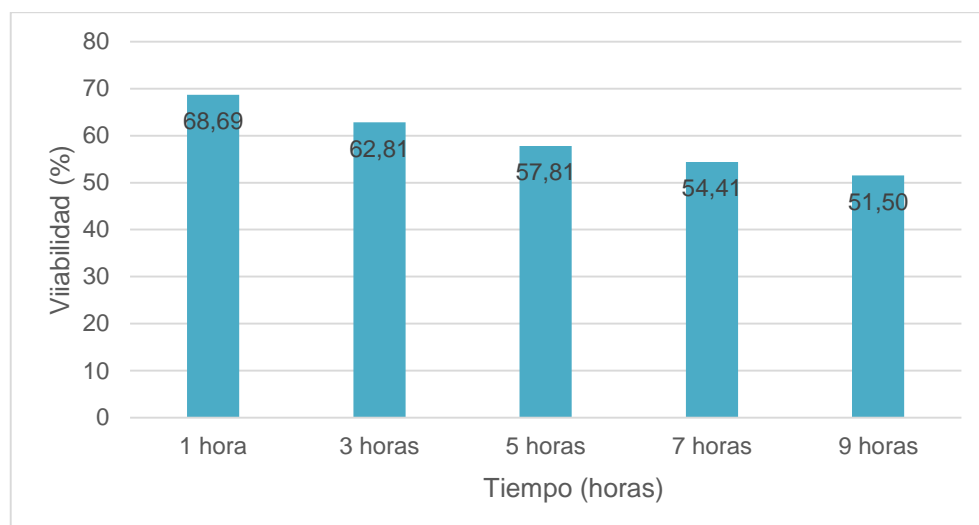
Para determinar la viabilidad en función del tiempo se tomó como referencia la media ya que representa un valor promedio entre los datos obtenidos.

Tabla 9: Viabilidad (%) de ovocitos bovinos a 1, 3, 5, 7 y 9 horas post mortem

HORA	VIABILIDAD (%)
1 hora	68,69
3 horas	62,81
5 horas	57,81
7 horas	54,41
9 horas	51,50

Elaborado por: Sierra, K. (2014)

Gráfico 6: Porcentaje de viabilidad de ovocitos bovinos a través del tiempo



Elaborado por: Sierra, K. (2014)

Al comparar los diferentes tratamientos se pudo observar una disminución de viabilidad siendo 66,66% trascurrida la primera hora después de la muerte del animal el porcentaje de viabilidad más alto, y 50% a las 9 horas en donde obtenemos el menor porcentaje de viabilidad. Estos porcentajes de viabilidad se consideran altos al ser comparados con los resultados de la investigación de Collantes (2011) en donde el porcentaje de viabilidad a 1 hora post mortem fue de 55% y a las 9 horas fue de 34%, manteniendo los ovarios a temperatura ambiente (23-30° C) se puede observar que obtuvimos un porcentaje considerablemente más alto al mantenerlos a una temperatura de 38°C.

3.6.1.2. Análisis de regresión lineal de variables.

Se tomó como variable dependiente al porcentaje de viabilidad y como variable independiente o regresora al tiempo transcurrido post mortem. El siguiente gráfico, obtenido por defecto, muestra el comportamiento de las variables:

Gráfico 7: Regresión lineal de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos



Elaborado por: Sierra, K. (2014)

Tabla 10: Análisis de regresión lineal del porcentaje de viabilidad de ovocitos bovinos

Variable	N	R ²	R ² Aj
%Viabiles	5	0,98	0,98

Elaborado por: Sierra, K. (2014)

Tabla 11: Coeficientes de Regresión y estadísticos asociados del porcentaje de viabilidad de ovocitos bovinos

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
const	71,88	1,44	66,90	72,58	48,48	<0,0001
Momentos de recolección	-4,28	0,25	-2,63	-1,65	-8,54	<0,0001

Elaborado por: Sierra, K. (2014)

Tomando la información sobre los coeficientes de regresión se puede escribir la ecuación del modelo ajustado:

$$y = a + bx$$

$$y = 71,88 - 4,24x$$

Esta ecuación permite estimar el valor de y (valor predicho) para un valor de x. El modelo ajustado puede ser usado con fines predictivos; por ejemplo, para un tiempo post mortem de 12 horas el porcentaje de viabilidad de los ovocitos será:

$$y = 71,88 - 4,24(12)$$

$$y = 21 \%$$

Este resultado, al igual que cualquier otra predicción deseada usando valores de X dentro o fuera del rango estudiado, puede obtenerse automáticamente al reemplazar x por una hora especificada.

Tabla 12: Cuadro de Análisis de Varianza de la viabilidad de ovocitos bovinos en los diferentes momentos de recolección

F.V.	GL	SC	CM	F CAL
Total	199	27189,97		
Momentos De Recolección	4	7486,44	1871,61	18,52
Error	195	19703,52	101,04	
CV%		17,02%		

Elaborado por: Sierra, K. (2014)

El coeficiente de variación (CV) es de 17,02 %, adecuado para este tipo de investigación. Al realizar el Análisis de varianza se determina que existen diferencias estadísticas significativas entre los momentos de recolección por lo que se procede a realizar la siguiente prueba de Tukey:

Tabla 13: Prueba de Tukey 5% para la viabilidad de ovocitos bovinos en los diferentes momentos de recolección

Momentos de Recolección (horas transcurridas)	Medias (%)	
1,00	68,70	A
3,00	62,81	A B
5,00	57,81	B C
7,00	54,41	C D
9,00	51,51	D

Elaborado por: Sierra, K. (2014)

Al realizar la prueba de Tukey en la viabilidad de ovocitos bovinos, se presentan 5 rangos de significación estadística ubicándose en el rango A la primera hora de obtención de ovocitos post mortem, en el rango AB la hora 3, en el rango BC la hora 5, en el rango CD las 7 horas y por último en el rango D la hora 9 de recolección post mortem de ovocitos.

Al comparar las medias, se observa que el porcentaje de viabilidad de ovocitos obtenido es mayor trascurrida 1 y 3 horas post mortem con una viabilidad de 68,7% y 62, 81% frente a las 9 horas que es de 51,51%, lo que nos indica que trascurrida 1 y 3 horas post mortem es el mejor momento para obtener la mayor cantidad de ovocitos bovinos.

c. Cantidad ovocitos recolectados a 1, 3, 5, 7 y 9 horas post mortem

La cantidad total de ovocitos recolectados en los diferentes momentos de recolección (1, 3, 5, 7 y 9 horas post mortem) se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 14: Cantidad ovocitos recolectados a 1, 3, 5,7 y 9 horas post mortem

Hora	N° Ovarios recolectados	N° Ovocitos Recolectados	Ovocitos Viables	Ovocitos No Viables	Ovocitos / ovario
1 hora	40	409	274	135	10,23
3 horas	40	406	256	150	10,15
5 horas	40	401	233	168	10,03
7 horas	40	400	216	184	10,00
9 horas	40	402	206	196	10,05
Total	200	2018	1183	833	10,09

Elaborado por: Sierra, K. (2014)

El método de corte o “slicing” nos permitió obtener un rendimiento de 10,09 ovocitos por ovario, lo cual es superior a la cifra reportada previamente por (Gomez, 2012) cuyo promedio ovocitos/ovario fue de 5,32 utilizando el mismo método y similar al obtenido por Gonzales citado por Gomez (2012) que fue de 12.8 ovocitos por ovario.

3.6.2. Verificación de hipótesis.

Al dar por finalizado el estudio de esta investigación y al analizar e interpretar los diferentes datos obtenidos de las variables evaluadas, se puede dar la validación de la hipótesis afirmativa en que se plantea: “Existe variación en la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem en relación con los periodos de tiempo de recolección” ya que se obtuvo un alto porcentaje de viabilidad de 68,7% y 62, 81% transcurrida 1 y 3 horas respectivamente, frente a las 9 horas que cuya viabilidad disminuye a 51,51%, lo que nos indica que transcurridas 1 y 3 horas post mortem son los mejores momentos para obtener la mayor cantidad de ovocitos bovinos viables.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

4.1. CONCLUSIONES.

- La cantidad total de ovocitos obtenidos de 200 ovarios de hembras bovinas sacrificadas en el Camal Municipal de Tulcán es de 2018 ovocitos, de los cuales 1185 (58,72%) se consideran viables y 833 (41,28%). Además el rendimiento de esta técnica de recolección, como es el método de corte nos permitió obtener un rendimiento de 10,09 ovocitos por ovario.
- El tiempo óptimo para obtener el mayor porcentaje de ovocitos viables en esta investigación es de 1 y 3 hora post mortem, ya que en ese tiempo se obtuvo un $68,7 \pm 1,89 \%$ y $62,81 \pm 1,68 \%$ de viabilidad respectivamente, frente a la menor tasa de viabilidad transcurridas 9 horas post mortem que fue un $51,51 \pm 1,32 \%$ de viabilidad.
- El tiempo transcurrido desde la muerte del animal influye en el porcentaje de viabilidad de los ovocitos, disminuyendo su viabilidad a medida que el tiempo aumenta.
- La ecuación obtenida en esta investigación mediante regresión lineal es $y = 71,88 - 4,24x$ con la cual se puede predecir el porcentaje de viabilidad a diferentes tiempos manteniendo los ovarios a una temperatura de 38°C reemplazando la x (tiempo) en la ecuación.

4.2. RECOMENDACIONES.

- En caso de presentarse una muerte súbita de un animal de buena genética es posible aprovechar su potencial genético con la extracción de los ovarios y manteniéndolos a temperatura de 38°C y extraer los ovocitos en el menor tiempo posible para conseguir una mayor cantidad de ovocitos viables.
- Es recomendable la utilización de la técnica de Slicing porque permite la obtención de un alto número de ovocitos post mortem ya que se obtiene el líquido folicular que se encuentra en el exterior e interior de los ovarios.
- En base a esta investigación se recomienda continuar con el siguiente paso a la obtención de ovocitos que es la maduración, con lo cual se comprobaría la viabilidad para maduración y su posterior fecundación in vitro para la obtención de embriones bovinos.
- Es importante divulgar y dar a conocer la aplicación de las biotecnologías reproductivas en animales, ya que esto promueve la continuación de las investigaciones en este ámbito, ya que se puede recuperar material genético viable lograr un aumento en la calidad genética, mejorando la producción de los animales, lo cual deriva en un aumento económico para el sector pecuario.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Ahuka, C., Montiel, F., & Ponciano, P. (2013). Producción In Vitro y transferencia de embriones en bovinos. Veracruz, México.
- Apuntes de Biología para estudiantes y Profesores. (Junio de 2014). *Gametogénesis*. Obtenido de <http://www.biologiaescolar.com/2014/06/gametogenesis.html>
- Asamblea Constituyente. (2008). *Constitucion de la republica del Ecuador*. Quito.
- Benavides, L. A. (2012). Efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno sobre el desarrollo embrionario de Ovocitos Bovinos fecundados y cultivados In Vitro. Lima, Perú.
- Brito, R., & Tagle, L. (2009). *Fisiología de la reproducción animal: con elementos de biotecnología*. Cuba: Félix Varela.
- Caínzos, J. M. (Mayo de 2012). DISEÑO DE UN MEDIO DEFINIDO PARA LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS EN BAJA TENSIÓN DE OXIGENO. España.
- Caiza, F. (2013). *INIAP realizó seminario interinstitucional sobre Biotecnología Aplicada a la Reproducción Bovina*. Coordinación Comunicación INIAP.
- Carrasco, A. (2012). USO DE AZUL BRILLANTE DE CRESILO EN LA SELECCIÓN DE OVOCITOS . Valdivia, Chile.
- Collantes, J. I. (2011). *VIABILIDAD DE LOS OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS POST MORTEM, PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN-VITRO*. Obtenido de Repositorio de la Universidad de Guayaquil: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/891/1/Collantes%20Mendoza%20Jimmy188.pdf>
- Cuadrado, F. (Junio de 2012). *Evaluación de ovocitos bovinos por microscopía de luz polarizada*. Obtenido de <http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/4014/1/TFMdef.pdf>
- FAO, F. a. (2007). *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura*. Roma: Comisión de los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura.

- FAO, F. a. (2011). Informe sobre los progresos realizados en la aplicación del Plan de Acción Mundial sobre los Recursos Zoogenéticos.
- Gardón, J. (2000). *Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario, obtenidos por fertilización in vitro*. Córdoba: Universidad de Córdoba.
- Gomez, O. (2012). TECNICAS DEL SLICING Y ASPIRACION FOLICULAR EN LA EFICIENCIA DE LA RECUPERACION DE OVOCITOS BOVINOS CRIOLLOS POSTMORTEN EN EL CAMAL. *Asociación Peruana de Reproducción Animal*, 38-39.
- González, V. (2012). *EVALUACIÓN DE LA EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO EN LA MADURACIÓN IN VITRO DE TRES TIPOS MORFOLÓGICOS DE OOCITOS PROCEDENTES DE OVARIOS DE VACAS DE MATADERO DE LA CIUDAD DE LOJA CON DOS MEDIOS DE MADURACIÓN*. Loja: CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.
- Herrera, L., & Jara, O. (2009). *COMPARACIÓN DE DOS SUPLEMENTOS PARA MADURACIÓN*. Bogotá: UNIVERSIDAD DE LA SALLE.
- Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. (2014). Obtenido de <http://iibce.edu.uy/uas/biomolec/ovocito.htm>
- Lorenzo, P. (1992). *MADURACION IN VITRO DE OOCITOS DE GANADO VACUNO*. Madrid: Departamento de Fisiología Animal. Obtenido de <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/D/2/AD2007601.pdf>
- Mellisho, E. (2010). *Biología Reproductiva*. Perú: La Molina.
- Palma, G. (2001). *Biología de la reproducción*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Santa Cruz, C. (2012). Efecto de tres suplementos macromoléculas (pva, pvp y bsa) sobre la tasa de maduración, división y desarrollo embrionario in vitro de ovocitos bovinos procedentes de ovarios obtenidos de camal. Lima, Perú.

Universidad de Sevilla. (2014). *Láminas Ovario*. Obtenido de <http://personal.us.es/salles/OMA/docencia/practicas/difiore/laminas/Ovario-b128.htm>>

UPEC. (2011). *Manual para la presentación del perfil del proyecto de tesis de grado, proyecto de tesis de grado e informe final de tesis de grado*. Tulcan: UPEC.

Valencia, E. (2012). *Maduración in vitro de ovocitos colectados post mortem de ovarios de vacas Holstein Friesian y Jersey*. Quito.

VI. ANEXOS.

Anexo 1: Cantidad de ovocitos obtenidos 1 hora post mortem

	Fecha	Hora	Hora	Tiempo	Viabiles	No Viabiles	Total	% V	% NV
1	25/08/2014	10:49	11:50	01:01:00	9	0	9	100,00	0,00
2	25/08/2014	10:49	11:53	01:04:00	5	3	8	62,50	37,50
3	25/08/2014	10:58	12:04	01:06:00	5	5	10	50,00	50,00
4	25/08/2014	10:58	12:04	01:06:00	7	2	9	77,78	22,22
5	31/08/2014	12:47	13:49	01:02:00	8	3	11	72,73	27,27
6	31/08/2014	12:47	13:49	01:02:00	9	5	14	64,29	35,71
7	04/09/2014	12:57	14:06	01:09:00	6	6	12	50,00	50,00
8	04/09/2014	12:57	14:06	01:09:00	7	5	12	58,33	41,67
9	10/09/2014	10:50	11:50	01:00:00	4	2	6	66,67	33,33
10	10/09/2014	10:50	11:55	01:05:00	3	1	4	75,00	25,00
11	01/10/2014	10:20	11:21	01:01:00	9	4	13	69,23	30,77
12	01/10/2014	10:20	11:24	01:04:00	5	2	7	71,43	28,57
13	01/10/2014	10:35	11:28	00:53:00	8	3	11	72,73	27,27
14	01/10/2014	10:35	11:35	01:00:00	7	2	9	77,78	22,22
15	02/10/2014	11:40	12:40	01:00:00	5	1	6	83,33	16,67
16	02/10/2014	11:40	12:40	01:00:00	4	2	6	66,67	33,33
17	02/10/2014	11:50	12:50	01:00:00	9	12	21	42,86	57,14
18	02/10/2014	11:50	12:50	01:00:00	11	1	12	91,67	8,33
19	08/10/2014	10:30	11:38	01:08:00	7	3	10	70,00	30,00
20	08/10/2014	10:30	11:38	01:08:00	7	2	9	77,78	22,22
21	08/10/2014	10:50	11:54	01:04:00	3	2	5	60,00	40,00
22	08/10/2014	10:50	11:54	01:04:00	6	1	7	85,71	14,29
23	08/10/2014	10:54	11:57	01:03:00	2	2	4	50,00	50,00
24	08/10/2014	10:54	11:57	01:03:00	6	2	8	75,00	25,00
25	13/10/2014	10:35	11:36	01:01:00	7	4	11	63,64	36,36
26	13/10/2014	10:35	11:38	01:03:00	7	3	10	70,00	30,00
27	13/10/2014	10:40	11:40	01:00:00	6	2	8	75,00	25,00
28	15/10/2014	10:20	11:20	01:00:00	5	4	9	55,56	44,44
29	15/10/2014	10:20	11:26	01:06:00	7	5	12	58,33	41,67
30	15/10/2014	10:30	11:34	01:04:00	6	2	8	75,00	25,00
31	15/10/2014	10:30	11:40	01:10:00	7	3	10	70,00	30,00
32	15/10/2014	10:40	11:47	01:07:00	8	4	12	66,67	33,33
33	15/10/2014	10:47	11:54	01:07:00	6	1	7	85,71	14,29
34	15/10/2014	10:47	11:54	01:07:00	6	5	11	54,55	45,45
35	20/10/2014	10:00	11:00	01:00:00	10	4	14	71,43	28,57
36	20/10/2014	10:00	11:00	01:00:00	12	9	21	57,14	42,86
37	20/10/2014	10:05	11:07	01:02:00	9	5	14	64,29	35,71
38	20/10/2014	10:22	11:30	01:08:00	10	6	16	62,50	37,50

39	20/10/2014	10:56	11:58	01:02:00	6	3	9	66,67	33,33
40	20/10/2014	10:56	12:00	01:04:00	8	2	10	80,00	20,00

Anexo 2: Cantidad de ovocitos obtenidos 3 horas post mortem

	Fecha	Hora	Hora	Tiempo	Viabiles	No Viabiles	total	% V	% NV
1	04/09/2014	11:57	15:00	03:03:00	11	5	16	68,75	31,25
2	04/09/2014	11:57	15:05	03:08:00	8	3	11	72,73	27,27
3	10/09/2014	9:55	12:50	02:55:00	11	3	14	78,57	21,43
4	10/09/2014	10:05	13:08	03:03:00	4	4	8	50,00	50,00
5	10/09/2014	10:30	13:33	03:03:00	9	4	13	69,23	30,77
6	10/09/2014	10:30	13:33	03:03:00	7	4	11	63,64	36,36
7	10/09/2014	10:40	13:45	03:05:00	2	3	5	40,00	60,00
8	10/09/2014	10:40	13:45	03:05:00	4	1	5	80,00	20,00
9	02/10/2014	10:54	13:47	02:53:00	6	3	9	66,67	33,33
10	02/10/2014	10:54	13:50	02:56:00	5	3	8	62,50	37,50
11	02/10/2014	10:54	13:50	02:56:00	6	4	10	60,00	40,00
12	02/10/2014	11:05	14:05	03:00:00	5	3	8	62,50	37,50
13	02/10/2014	11:05	14:05	03:00:00	7	4	11	63,64	36,36
14	02/10/2014	11:05	14:11	03:06:00	3	4	7	42,86	57,14
15	02/10/2014	11:15	14:15	03:00:00	6	2	8	75,00	25,00
16	02/10/2014	11:18	14:20	03:02:00	9	4	13	69,23	30,77
17	02/10/2014	11:18	14:25	03:07:00	4	3	7	57,14	42,86
18	02/10/2014	11:50	14:52	03:02:00	10	6	16	62,50	37,50
19	02/10/2014	11:50	14:52	03:02:00	6	5	11	54,55	45,45
20	08/10/2014	9:45	12:45	03:00:00	4	5	9	44,44	55,56
21	08/10/2014	9:45	12:45	03:00:00	5	3	8	62,50	37,50
22	08/10/2014	9:45	12:48	03:03:00	7	4	11	63,64	36,36
23	08/10/2014	9:52	12:51	02:59:00	6	4	10	60,00	40,00
24	08/10/2014	9:52	12:54	03:02:00	9	5	14	64,29	35,71
25	08/10/2014	10:08	13:08	03:00:00	6	2	8	75,00	25,00
26	08/10/2014	10:08	13:11	03:03:00	8	4	12	66,67	33,33
27	09/10/2014	12:24	15:25	03:01:00	8	2	10	80,00	20,00
28	09/10/2014	12:24	15:29	03:05:00	9	6	15	60,00	40,00
29	13/10/2014	9:00	12:00	03:00:00	10	6	16	62,50	37,50
30	13/10/2014	9:00	12:00	03:00:00	2	2	4	50,00	50,00
31	13/10/2014	9:12	12:15	03:03:00	7	10	17	41,18	58,82
32	13/10/2014	9:12	12:15	03:03:00	7	2	9	77,78	22,22
33	13/10/2014	9:12	12:15	03:03:00	9	8	17	52,94	47,06
34	13/10/2014	9:12	12:15	03:03:00	7	3	10	70,00	30,00

35	15/10/2014	9:25	12:25	03:00:00	2	1	3	66,67	33,33
36	15/10/2014	9:25	12:30	03:05:00	7	4	11	63,64	36,36
37	15/10/2014	9:30	12:30	03:00:00	7	2	9	77,78	22,22
38	15/10/2014	9:30	12:34	03:04:00	6	3	9	66,67	33,33
39	15/10/2014	9:35	12:34	02:59:00	4	3	7	57,14	42,86
40	15/10/2014	9:35	12:35	03:00:00	3	3	6	50,00	50,00

Anexo 3: Cantidad de ovocitos obtenidos 5 horas post mortem

N°	Fecha	Hora	Hora	Tiempo	Viabiles	No Viabiles	total	% V	% NV
1	31/08/2014	10:29	15:33	05:04:00	6	3	9	66,67	33,33
2	31/08/2014	10:29	15:35	05:06:00	6	5	11	54,55	45,45
3	31/08/2014	10:41	15:40	04:59:00	6	4	10	60,00	40,00
4	31/08/2014	10:41	15:44	05:03:00	4	9	13	30,77	69,23
5	31/08/2014	10:46	15:48	05:02:00	3	2	5	60,00	40,00
6	01/09/2014	10:15	15:12	04:57:00	6	3	9	66,67	33,33
7	01/09/2014	10:15	15:15	05:00:00	7	4	11	63,64	36,36
8	01/09/2014	10:18	15:19	05:01:00	5	3	8	62,50	37,50
9	01/09/2014	10:18	15:23	05:05:00	6	2	8	75,00	25,00
10	01/09/2014	10:21	15:27	05:06:00	6	4	10	60,00	40,00
11	01/09/2014	10:21	15:30	05:09:00	5	7	12	41,67	58,33
12	01/09/2014	10:23	15:30	05:07:00	3	5	8	37,50	62,50
13	01/09/2014	10:25	15:34	05:09:00	2	2	4	50,00	50,00
14	04/09/2014	11:39	16:39	05:00:00	10	6	16	62,50	37,50
15	04/09/2014	11:39	16:33	04:54:00	4	3	7	57,14	42,86
16	04/09/2014	11:45	16:43	04:58:00	12	5	17	70,59	29,41
17	04/09/2014	11:49	16:51	05:02:00	6	5	11	54,55	45,45
18	04/09/2014	11:49	17:00	05:11:00	7	5	12	58,33	41,67
19	04/09/2014	12:20	17:12	04:52:00	5	3	8	62,50	37,50
20	04/09/2014	12:20	17:15	04:55:00	8	6	14	57,14	42,86
21	04/09/2014	12:25	17:20	04:55:00	2	1	3	66,67	33,33
22	04/09/2014	12:33	17:40	05:07:00	3	4	7	42,86	57,14
23	09/10/2014	11:40	16:48	05:08:00	4	3	7	57,14	42,86
24	09/10/2014	11:40	16:48	05:08:00	4	8	12	33,33	66,67
25	09/10/2014	11:55	17:00	05:05:00	4	2	6	66,67	33,33
26	09/10/2014	11:55	17:00	05:05:00	9	5	14	64,29	35,71
27	09/10/2014	12:10	17:20	05:10:00	9	2	11	81,82	18,18
28	09/10/2014	12:10	17:20	05:10:00	5	2	7	71,43	28,57
29	09/10/2014	12:10	17:20	05:10:00	3	3	6	50,00	50,00
30	09/10/2014	12:29	17:35	05:06:00	3	2	5	60,00	40,00

31	09/10/2014	12:29	17:35	05:06:00	9	6	15	60,00	40,00
32	09/10/2014	12:35	17:42	05:07:00	6	5	11	54,55	45,45
33	13/10/2014	10:00	15:10	05:10:00	14	5	19	73,68	26,32
34	13/10/2014	10:00	15:10	05:10:00	4	5	9	44,44	55,56
35	13/10/2014	10:07	15:13	05:06:00	7	5	12	58,33	41,67
36	13/10/2014	10:07	15:13	05:06:00	6	4	10	60,00	40,00
37	13/10/2014	10:11	15:15	05:04:00	8	5	13	61,54	38,46
38	13/10/2014	10:11	15:15	05:04:00	5	4	9	55,56	44,44
39	13/10/2014	10:15	15:18	05:03:00	7	6	13	53,85	46,15
40	13/10/2014	10:15	15:18	05:03:00	4	5	9	44,44	55,56

Anexo 4: Cantidad de ovocitos obtenidos 7 horas post mortem

N°	Fecha	Hora	Hora	Tiempo	Viables	No Viables	total	% V	% NV
1	28/08/2014	9:44	16:37	06:53:00	6	5	11	54,55	45,45
2	28/08/2014	9:44	16:37	06:53:00	4	5	9	44,44	55,56
3	28/08/2014	9:53	17:00	07:07:00	3	1	4	75,00	25,00
4	28/08/2014	9:53	17:03	07:10:00	3	4	7	42,86	57,14
5	31/08/2014	10:01	17:07	07:06:00	5	3	8	62,50	37,50
6	31/08/2014	10:01	17:07	07:06:00	8	6	14	57,14	42,86
7	31/08/2014	10:08	17:11	07:03:00	6	4	10	60,00	40,00
8	31/08/2014	10:17	17:15	06:58:00	6	6	12	50,00	50,00
9	31/08/2014	10:17	17:17	07:00:00	6	5	11	54,55	45,45
10	31/08/2014	10:20	17:21	07:01:00	4	5	9	44,44	55,56
11	31/08/2014	10:23	17:26	07:03:00	4	6	10	40,00	60,00
12	01/09/2014	10:25	17:25	07:00:00	6	5	11	54,55	45,45
13	01/09/2014	10:37	17:32	06:55:00	4	3	7	57,14	42,86
14	01/09/2014	10:49	17:39	06:50:00	10	8	18	55,56	44,44
15	01/10/2014	9:30	17:03	07:33:00	6	5	11	54,55	45,45
16	01/10/2014	9:30	17:03	07:33:00	5	4	9	55,56	44,44
17	01/10/2014	9:53	17:07	07:14:00	2	1	3	66,67	33,33
18	01/10/2014	9:53	17:07	07:14:00	4	3	7	57,14	42,86
19	01/10/2014	9:53	17:11	07:18:00	5	3	8	62,50	37,50
20	01/10/2014	10:21	17:21	07:00:00	3	3	6	50,00	50,00
21	01/10/2014	10:29	17:29	07:00:00	4	5	9	44,44	55,56
22	01/10/2014	10:29	17:33	07:04:00	5	4	9	55,56	44,44
23	01/10/2014	11:01	17:51	06:50:00	4	4	8	50,00	50,00
24	01/10/2014	11:13	18:05	06:52:00	7	4	11	63,64	36,36
25	01/10/2014	11:13	18:12	06:59:00	6	5	11	54,55	45,45
26	02/10/2014	10:05	17:05	07:00:00	7	6	13	53,85	46,15
27	02/10/2014	10:14	17:14	07:00:00	9	4	13	69,23	30,77

28	02/10/2014	10:14	17:17	07:03:00	5	5	10	50,00	50,00
29	02/10/2014	10:19	17:20	07:01:00	5	4	9	55,56	44,44
30	02/10/2014	10:27	17:27	07:00:00	6	7	13	46,15	53,85
31	02/10/2014	10:27	17:30	07:03:00	7	5	12	58,33	41,67
32	02/10/2014	10:45	17:40	06:55:00	4	3	7	57,14	42,86
33	02/10/2014	10:45	17:48	07:03:00	6	4	10	60,00	40,00
34	02/10/2014	11:05	18:00	06:55:00	4	5	9	44,44	55,56
35	02/10/2014	11:11	18:12	07:01:00	5	8	13	38,46	61,54
36	02/10/2014	11:17	18:24	07:07:00	7	5	12	58,33	41,67
37	08/10/2014	11:17	18:30	07:13:00	4	3	7	57,14	42,86
38	08/10/2014	11:29	18:24	06:55:00	5	4	9	55,56	44,44
39	08/10/2014	11:29	19:30	08:01:00	5	5	10	50,00	50,00
40	08/10/2014	11:41	19:40	07:59:00	11	9	20	55,00	45,00

N°	Fecha	Hora	Hora	Tiempo	Viabiles	No Viabiles	total	% V	% NV
1	28/08/2014	9:44	16:37	06:53:00	6	4	10	60,00	40,00
2	28/08/2014	9:44	16:37	06:53:00	4	5	9	44,44	55,56
3	31/08/2014	9:53	17:00	07:07:00	3	1	4	75,00	25,00
4	31/08/2014	9:53	17:03	07:10:00	3	4	7	42,86	57,14
5	31/08/2014	10:01	17:07	07:06:00	5	3	8	62,50	37,50
6	31/08/2014	10:01	17:07	07:06:00	8	6	14	57,14	42,86
7	31/08/2014	10:08	17:11	07:03:00	6	4	10	60,00	40,00
8	31/08/2014	10:17	17:15	06:58:00	6	6	12	50,00	50,00
9	31/08/2014	10:17	17:17	07:00:00	6	5	11	54,55	45,45
10	31/08/2014	10:20	17:21	07:01:00	4	5	9	44,44	55,56
11	31/08/2014	10:23	17:26	07:03:00	4	6	10	40,00	60,00
12	01/09/2014	10:25	17:25	07:00:00	6	5	11	54,55	45,45
13	01/09/2014	10:37	17:32	06:55:00	4	3	7	57,14	42,86
14	01/09/2014	10:49	17:39	06:50:00	10	8	18	55,56	44,44
15	01/10/2014	9:30	17:03	07:33:00	6	3	9	66,67	33,33
16	01/10/2014	9:30	17:03	07:33:00	4	3	7	57,14	42,86
17	01/10/2014	9:53	17:07	07:14:00	2	1	3	66,67	33,33
18	01/10/2014	9:53	17:07	07:14:00	4	3	7	57,14	42,86
19	01/10/2014	9:53	17:11	07:18:00	5	3	8	62,50	37,50
20	01/10/2014	10:21	17:21	07:00:00	8	6	14	57,14	42,86
21	01/10/2014	10:29	17:29	07:00:00	4	5	9	44,44	55,56
22	01/10/2014	10:29	17:33	07:04:00	5	4	9	55,56	44,44
23	01/10/2014	11:01	17:51	06:50:00	4	4	8	50,00	50,00
24	01/10/2014	11:13	18:05	06:52:00	7	4	11	63,64	36,36

25	01/10/2014	11:13	18:12	06:59:00	3	7	10	30,00	70,00
26	02/10/2014	10:05	17:05	07:00:00	7	7	14	50,00	50,00
27	02/10/2014	10:14	17:14	07:00:00	9	4	13	69,23	30,77
28	02/10/2014	10:14	17:17	07:03:00	2	3	5	40,00	60,00
29	02/10/2014	10:19	17:20	07:01:00	6	5	11	54,55	45,45
30	02/10/2014	10:27	17:27	07:00:00	6	7	13	46,15	53,85
31	02/10/2014	10:27	17:30	07:03:00	8	5	13	61,54	38,46
32	02/10/2014	10:45	17:40	06:55:00	4	3	7	57,14	42,86
33	02/10/2014	10:45	17:48	07:03:00	6	4	10	60,00	40,00
34	02/10/2014	11:05	18:00	06:55:00	4	5	9	44,44	55,56
35	08/10/2014	11:11	18:12	07:01:00	5	9	14	35,71	64,29
36	08/10/2014	11:17	18:24	07:07:00	7	5	12	58,33	41,67
37	16/10/2014	11:17	18:30	07:13:00	4	3	7	57,14	42,86
38	16/10/2014	11:29	18:24	06:55:00	11	9	20	55,00	45,00
39	16/10/2014	11:29	19:30	08:01:00	5	5	10	50,00	50,00
40	16/10/2014	11:41	19:40	07:59:00	10	4	14	71,43	28,57

Anexo 5: Cantidad de ovocitos obtenidos 9 horas post mortem

	Fecha	Hora	Hora	Tiempo	Viables	No Viables	total	% V	% NV
1	25/08/2014	9:30	18:30	09:00:00	6	4	10	60,00	40,00
2	25/08/2014	9:30	18:35	09:05:00	4	3	7	57,14	42,86
3	31/08/2014	9:37	18:40	09:03:00	6	6	12	50,00	50,00
4	31/08/2014	9:37	18:46	09:09:00	4	5	9	44,44	55,56
5	31/08/2014	9:40	18:50	09:10:00	5	4	9	55,56	44,44
6	31/08/2014	9:50	18:54	09:04:00	2	2	4	50,00	50,00
7	31/08/2014	9:50	18:58	09:08:00	3	9	12	25,00	75,00
8	31/08/2014	10:00	19:05	09:05:00	3	2	5	60,00	40,00
9	01/09/2014	10:15	19:08	08:53:00	5	4	9	55,56	44,44
10	01/09/2014	10:15	19:12	08:57:00	6	5	11	54,55	45,45
11	04/09/2014	9:12	18:10	08:58:00	5	4	9	55,56	44,44
12	04/09/2014	9:12	18:14	09:02:00	3	4	7	42,86	57,14
13	04/09/2014	9:30	18:18	08:48:00	9	11	20	45,00	55,00
14	04/09/2014	9:30	18:22	08:52:00	8	5	13	61,54	38,46
15	04/09/2014	9:37	18:26	08:49:00	6	5	11	54,55	45,45
16	04/09/2014	9:37	18:30	08:53:00	7	5	12	58,33	41,67
17	01/10/2014	9:30	18:30	09:00:00	6	5	11	54,55	45,45
18	01/10/2014	9:30	18:35	09:05:00	3	3	6	50,00	50,00

19	01/10/2014	9:30	18:40	09:10:00	5	5	10	50,00	50,00
20	01/10/2014	9:53	18:55	09:02:00	5	7	12	41,67	58,33
21	01/10/2014	9:53	18:57	09:04:00	5	9	14	35,71	64,29
22	01/10/2014	9:53	19:04	09:11:00	7	6	13	53,85	46,15
23	01/10/2014	10:00	19:11	09:11:00	4	4	8	50,00	50,00
24	01/10/2014	10:05	19:18	09:13:00	3	3	6	50,00	50,00
25	01/10/2014	10:05	19:22	09:17:00	4	3	7	57,14	42,86
26	01/10/2014	10:21	19:32	09:11:00	4	5	9	44,44	55,56
27	01/10/2014	10:29	19:35	09:06:00	5	6	11	45,45	54,55
28	01/10/2014	10:29	19:38	09:09:00	4	5	9	44,44	55,56
29	02/10/2014	9:40	18:50	09:10:00	8	5	13	61,54	38,46
30	02/10/2014	9:50	18:54	09:04:00	5	2	7	71,43	28,57
31	02/10/2014	9:30	18:30	09:00:00	3	3	6	50,00	50,00
32	02/10/2014	9:30	18:35	09:05:00	5	4	9	55,56	44,44
33	02/10/2014	9:37	18:40	09:03:00	6	4	10	60,00	40,00
34	02/10/2014	9:37	18:46	09:09:00	8	5	13	61,54	38,46
35	08/10/2014	9:40	18:50	09:10:00	5	5	10	50,00	50,00
36	08/10/2014	9:50	18:54	09:04:00	9	7	16	56,25	43,75
37	16/10/2014	7:18	16:10	08:52:00	5	6	11	45,45	54,55
38	16/10/2014	7:18	16:10	08:52:00	2	3	5	40,00	60,00
39	16/10/2014	7:21	16:10	08:49:00	6	5	11	54,55	45,45
40	16/10/2014	7:21	16:10	08:49:00	7	8	15	46,67	53,33

