

UNIVERSIDAD PERUANA LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA



UPLA
UNIVERSIDAD PERUANA LOS ANDES

TESIS:

“EFECTO DE DOS TIPOS DE ESTRÓGENO SOBRE LA ONDA FOLICULAR PARA RECOLECCIÓN DE OVOCITOS *IN VIVO* EN VACAS BROWN SWISS”.

PRESENTADO POR:

Autor : Andrea Rosario Peña Veliz

Asesor : MV. Selva Quiroz Meza

Línea de Investigación Institucional: Salud y Gestión de la Salud

HUANCAYO - 2023

DEDICATORIA

A mis padres, por su infinito amor al guiar mi camino para lograr todos mis objetivos.

AGRADECIMIENTO

A mis docentes de la E.P. Medicina Veterinaria y Zootecnia, por sus enseñanzas y consejos durante toda mi vida universitaria e incluso después.

Al grupo de investigadores, Dr. Carlos Quispe Eulogio, Dr. Ide Unchupaico Payano y Dra Edith Ancco Gomez, quienes hicieron posible la ejecución de la presente investigación.

A mi oso gris, aquel que camina a mi lado, no me deja flaquear y me impulsa a seguir cumpliendo metas.

Por último, a esas amistades que te extienden la mano en cualquier momento y a cualquier hora.

A todos y cada uno, mil gracias por todo.

CONSTANCIA

DE SIMILITUD DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN POR EL SOFTWARE DE PREVENCIÓN DE PLAGIO TURNITIN

La Dirección de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud, hace constar por la presente, que el Informe Final de Tesis titulado:

EFFECTO DE DOS TIPOS DE ESTRÓGENO SOBRE LA ONDA FOLICULAR PARA RECOLECCIÓN DE OVOCITOS IN VIVO EN VACAS BROWN SWISS

Cuyo autor (es) : **PEÑA VELIZ ANDREA ROSARIO**
Facultad : **CIENCIAS DE LA SALUD**
Escuela Profesional : **MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**
Asesor (a) : **MV. QUIROZ MEZA SELVA DEL PILAR**

Que fue presentado con fecha: 29/03/2023 y después de realizado el análisis correspondiente en el software de prevención de plagio Turnitin con fecha 10/04/2023; con la siguiente configuración del software de prevención de plagio Turnitin:

- Excluye bibliografía
- Excluye citas
- Excluye cadenas menores a 20 palabras
- Otro criterio (especificar)

Dicho documento presenta un porcentaje de similitud de 26%.

En tal sentido, de acuerdo a los criterios de porcentajes establecidos en el Artículo N° 11 del Reglamento de uso de software de prevención de plagio, el cual indica que no se debe superar el 30%. Se declara, que el trabajo de investigación: si contiene un porcentaje aceptable de similitud.

Observaciones: Se analizó con el software dos veces.

En señal de conformidad y verificación se firma y sella la presente constancia.

Huancayo, 10 de abril de 2023

UNIVERSIDAD PERUANA LOS ANDES
Facultad de Ciencias de la Salud



[Firma]
Ph.D. EDITH ANCCO GOMEZ
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

CONSTANCIA N° 154 - DUI - FCS - UPLA/2023

c.c.: Archivo
EAG/vjchp

CONTENIDO

Caratula	1
Dedicatoria	2
Agradecimiento	3
Índice	5
Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
CAPITULO I: Planteamiento del Problema	13
1.1 Descripción del Problema	13
1.2 Delimitación del Problema.....	14
1.3 Formulación del Problema	14
1.3.1 Problema general	14
1.3.2 Problemas específicos	14
1.4 Justificación	15
1.4.1 Justificación social	15
1.4.2 Justificación teórica	15
1.4.3 Justificación metodológica	15
1.5 Objetivos	16
1.5.1 Problema general	16
1.5.2 Problemas específicos	16
CAPITULO II: Marco Teórico	17
2.1 Antecedentes de Investigación	17
2.1.1 A nivel internacional	17
2.1.2 A nivel nacional	19
2.2 Bases Teóricas	19
2.2.1 Antecedentes de la colección de ovocitos guiada por ultrasonografía	19
2.2.2 Dinámica de la onda folicular	20
2.2.3 Búsqueda y clasificación de COCs	21
2.2.4 Factores que afectan la colección de ovocitos	22
2.2.5 Métodos empleados para la colección de ovocitos	22
a) Obtención de ovocitos provenientes de camal	22

b) Obtención de ovocitos mediante la técnica de ovum pick up	23
2.2.6 Uso de hormonas para sincronización de onda folicular	24
2.3 Marco Conceptual	25
2.3.1 Calidad de ovocitos	25
2.3.2 Cantidad de ovocitos	25
2.3.3 Folículo ovárico	25
CAPITULO III: Hipótesis	26
3.1 Hipótesis General	26
3.2 Hipótesis Especificas	26
3.3 Variables	26
3.3.1 Variable independiente	26
3.3.2 Variable dependiente	26
3.3.3 Operacionalización de variables	27
CAPITULO IV: Metodología	28
4.1 Método de Investigación	28
4.2 Tipo de Investigación	28
4.3 Nivel de Investigación.....	28
4.4 Diseño de Investigación	28
4.5 Población y Muestra.....	29
4.5.1 Población	29
4.5.2 Muestra y tipo de muestreo	29
Criterios de inclusión	29
Criterios de exclusión	29
4.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	29
4.6.1 Técnica de investigación	29
4.6.2 Instrumento de investigación	29
4.6.3 Selección y distribución	30
4.6.4 Técnicas específicas	30
Sincronización de la onda folicular (aplicación de tratamientos)	30
Colección de ovocitos mediante la técnica ovum pick up	30
Búsqueda y clasificación de ovocitos	31
4.7 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos	32
4.7.1 Análisis estadístico	32
4.8 Aspectos éticos de la investigación	33

CAPITULO V: Resultados	35
5.1 Descripción de Resultados	35
Análisis y Discusión de Resultados	39
Conclusiones	41
Recomendaciones	42
Referencias Bibliográficas	43
Anexos	48
1.	
2. Anexo n°2: Constancia de similitud (turnitin)	4
a) Matriz de consistencia	48
b) Matriz de operacionalización de variables	49
c) Ficha de recolección de datos	50
d) Base de datos	52
e) Pruebas de normalidad para las variables medidas	53
f) Pruebas de comparación de medias de Duncan de las variables evaluadas	56
g) Evidencias fotográficas	60

Tablas

Tabla 1: Clasificación de la calidad de los ovocitos	20
Tabla 2: Efecto de los tratamientos con benzoato de estradiol y cipionato de estradiol sobre la cantidad de folículos de diferentes diámetros y el número total de folículos recuperados por aspiración folicular	34
Tabla 3: Evaluación de las diferencias entre las vacas incluidas en el estudio para ambos tratamientos y en relación a las variables en cantidad	35
Tabla 4: Efecto de los tratamientos con benzoato de estradiol y cipionato de estradiol sobre la calidad de ovocitos y el número total de ovocitos recuperados por aspiración folicular	36
Tabla 5: Evaluación de las diferencias entre las vacas incluidas en el estudio para ambos tratamientos y en relación a las variables de calidad	36

Figuras

Figura 1: Esquema de la colección de ovocitos con la técnica de ovum pick up	30
Figura 2: Calidades de ovocitos	31

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar el efecto de dos fuentes de estrógeno (cipionato de estradiol y benzoato de estradiol) sobre la onda folicular en relación a la cantidad y calidad de ovocitos en vacas de la raza Brown Swiss. Se utilizaron 7 vacas en total que fueron asignadas a dos tratamientos; T1: benzoato de estradiol y T2: cipionato de estradiol, los animales fueron evaluados en dos periodos, primero con el T1 y luego de un periodo de descanso de 2 meses con el T2, se realizaron 3 sesiones de colecta por animal, en total 21 colectas por cada tratamiento. Los animales del tratamiento 1 fueron sometidas a un protocolo de sincronización de onda folicular, el día “0” se insertó un dispositivo intravaginal DIB (0.6gr de progesterona, Syntex®, Argentina), aplicó (i.m.) 1.2 mg de BE (Estrovet®, Montana) y 0.524 mg de cloprostenol sódico (Lutaprost®, AgrovvetMarket). Los animales del tratamiento 2 recibieron el mismo protocolo donde la única diferencia fue el cipionato de estradiol. Para la toma de imágenes de utilizó un ecógrafo DP – 50 vet (Esaote®, Holanda) con transductor micro convexo a una frecuencia de 7.5 MHZ vía transvaginal con una guía de aspiración folicular (WTA®, Brasil). Las variables evaluadas fueron el conteo de número de folículos de 2 a 4 mm, 4 a 8 mm y mayores de 8mm de diámetro y la cantidad y calidad de ovocitos. El análisis estadístico fue a través de un análisis de varianza con una prueba de comparación de medias de Duncan. Los resultados muestran que no hubo diferencias entre los tratamientos sobre las variables evaluadas. Se concluye que las dos fuentes de estrógeno utilizado tienen efectos similares sobre la calidad y cantidad de ovocitos colectados a través de la técnica de ovum pick up.

Palabras Claves: cipionato de estradiol, benzoato de estradiol, ovum pick up, onda folicular, ovocitos, Brown Swiss.

ABSTRACT

The objective of the study was to determine the effect of two sources of estrogen (estradiol cypionate and estradiol benzoate) on the follicular wave in relation to the quantity and quality of oocytes in Brown Swiss cows. A total of 7 cows were used, which were assigned to two treatments; T1: estradiol benzoate and T2: estradiol cypionate, the animals were evaluated in two periods, first with T1 and after a rest period of 2 months with T2, 3 collection sessions per animal were carried out, in total 21 collections for each treatment. The animals of treatment 1 were subjected to a follicular wave synchronization protocol, on day "0" an intravaginal DIB device (0.6gr of progesterone, Syntex®, Argentina) was inserted, applied (i.m.) 1.2 mg of BE (Estrovet®, Montana) and 0.524 mg cloprostenol sodium (Lutaprost ®, AgrovvetMarket). The animals of treatment 2 received the same protocol where the only difference was the estradiol cypionate. A DP – 50 vet ultrasound machine (Esaote®, Holland) with a micro-convex transducer at a frequency of 7.5 MHZ transvaginally with a follicular aspiration guide (WTA®, Brazil) was used for taking images. The variables evaluated were the count of the number of follicles from 2 to 4 mm, 4 to 8 mm and greater than 8 mm in diameter and the quantity and quality of oocytes. Statistical analysis was through an analysis of variance with a Duncan comparison of means test. The results show that there were no differences between the treatments on the variables evaluated. It is concluded that the two sources of estrogen used have similar effects on the quality and quantity of oocytes collected through the ovum pick up technique.

Key Words: estradiol cypionate, estradiol benzoate, ovum pick up, follicular wave, oocytes, Brown swiss.

INTRODUCCIÓN

En el siglo XX ingresaron las biotecnologías como uno de los más grandes énfasis del descubrimiento y avance científico, se comenzaron a realizar investigaciones referentes a la mejora genética, alta productividad, mayor porcentaje de preñez. En América del sur, ha comenzado a tener un gran impacto a lo largo de los 50 años, todo para la mejora genética y reproductiva en el ganado vacuno. Se cita que la producción de embriones se puede realizar mediante superovulación de donadoras, obteniendo ovocitos de donantes para los sistemas de fecundación in vitro (IVF). Sin embargo, en la región Junín y en el Valle del Mantaro no se viene evidenciado el uso de las biotecnologías con todas las ventajas que esto trae. Hay evidencia teórica que establece un crecimiento genético de más del 20% anual cuando se aplica la técnica de fertilización in vitro, comparado con otras biotecnologías como la inseminación artificial y producción de embriones in vivo con 3 y 9 % respectivamente. La presente investigación aborda este problema desde un aspecto clave dentro del proceso de fertilización in vitro y que tiene que ver con el enfoque de esta investigación que es evaluar los efectos de dos protocolos hormonales usando dos tipos de estrógeno que permitan establecer una eficiencia sobre la producción de folículos y consecuente recuperación de ovocitos mediante la técnica de ovum pick up. Se aplicó dos protocolos de sincronización de onda folicular con dos tipos de estrógeno distintos para iniciar una colecta de ovocitos donde las variables independientes fueron los dos tipos de protocolos hormonales. Las variables dependientes fueron la cantidad de folículos de 2 a 8 mm de diámetro y la cantidad y calidad de ovocitos colectados mediante la técnica de ovum pick up. Se realizó el análisis estadístico mediante un diseño de bloques completamente al azar.

La investigación incluye los siguientes capítulos:

Capítulo I, se describe el análisis y planteamiento del problema, se detalla la delimitación del problema, se presenta la formulación el problema general y los específicos, por último, se describen las justificaciones y los objetivos generales y los específicos.

Capítulo II, se contrasta las variables por los diferentes autores e investigaciones internacionales, nacionales y locales, basados en las bases teóricas y el marco conceptual.

Capítulo III, se plantea las hipótesis generales y específicas, además de las variables conceptuales y operacionales.

Capítulo IV, se describe la metodología usada en la presente investigación que comprende tipo, nivel y diseño. Se delimita la población y muestra, tipo de muestreo y las técnicas e instrumentos de recolección de datos, técnicas de procesamiento y los aspectos éticos de la investigación.

Capítulo V, se detallan los resultados y la contratación de las hipótesis.

Finalmente se expone el análisis y discusión de resultados, conclusiones, y recomendaciones. Posterior a ello se encuentran las referencias bibliográficas y anexos sobre la investigación.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del Problema

Las biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, la producción y transferencia de embriones y la fertilización in vitro son técnicas que están siendo ampliamente utilizadas con el objetivo de mejorar genéticamente los establos lecheros. Los problemas de fertilidad en vacas cuya producción de leche es alta hacen ineficiente las técnicas convencionales como la inseminación artificial. Es evidente que estas vacas cuya producción de leche es alta derivan nutrientes para este fin en desmedro de funciones secundarias como la reproductiva lo que trae como consecuencia bajas tasas de fertilidad. Por tal razón la implementación de técnicas como la fertilización in vitro son adecuadas para subsanar este problema de orden práctico. La producción de embriones se puede realizar mediante superovulación y fertilización in vivo (MOET) y con los sistemas “in vitro” que incluyen la fertilización in vitro (FIV) y la transferencia nuclear (NT) o clonación. La FIV es una tecnología que permite a los criadores obtener descendencia de vacas abiertas, vacas gestantes, vaquillonas vírgenes e incluso de donantes “problema” de alto valor genético, con infertilidad adquirida o que no responden a los tratamientos superovulatorios. (1). La técnica de FIV ha aumentado la eficiencia en la producción de embriones y es una solución a problemas de fertilidad incluso se puede usar semen sexado con altos índices de fertilidad (1). Es importante tener presente que, en condiciones naturales, menos del 0,1% de los folículos que produce una vaca llegan a ovulación (2). Sin embargo, los ovarios de vacas (*Bos taurus*) representan una fuente abundante y desaprovechada de germoplasma. Silva-Santos et al. (3) afirman que la población de folículos pre antrales varía de 109,000 a 89,000 entre el estatus de vaquilla a vaca.

Dentro de las ventajas de los sistemas in vitro se logra obtener un incremento en cuanto al número de embriones por animal de alto valor genético y salvar algunas limitaciones reproductivas en algunas especies, maximizando sus capacidades gaméticas (4). Explícitamente en el Perú las cuencas lecheras principales vienen teniendo un uso limitado de esta técnica debido a múltiples factores entre los que se mencionan la falta de personal capacitado y el control de los factores que conllevan a su éxito.

Uno de los factores más importantes es la obtención de un mayor número de folículos y como consecuencia mayor número de ovocitos que después desencadenara en una mayor tasa de blastocisto, sin embargo, en la actualidad no hay trabajos que permitan determinar la eficiencia de la colecta de ovocitos mediante protocolos hormonales y más aún en el Valle del Mantaro con todas sus condiciones.

Específicamente en la región Junín y en el Valle del Mantaro la implementación de biotecnologías para el mejoramiento genético es muy limitada debido a falta de políticas públicas gubernamentales, falta de iniciativas por parte de las universidades para transferir tecnologías de impacto y la falta de personal calificado con el conocimiento necesario para implementar la técnica. Bajo ese contexto es de suma importancia generar herramientas que permitan implementar estrategias avanzadas de manejo reproductivo y que sobre todo que estén a la vanguardia del avance científico como en otros países y regiones del país y sobre todo en orden de mejorar la economía de los ganaderos.

1.2 Delimitación del Problema

La presente investigación se desarrolló en la estación experimental El Mantaro de la Universidad Nacional del Centro del Perú, ubicado en la provincia de Jauja, distrito de Mantaro. La estación se encuentra a una altitud promedio de 3271 msnm, y una temperatura media de 15° C. El estudio fue realizado entre los meses de enero a marzo del 2020.

1.3 Formulación del Problema

1.3.1 Problema general

¿Cuál es el efecto de dos tipos de estrógeno sobre la onda folicular para recolección de ovocitos *in vivo* en vacas Brown Swiss?

1.3.2 Problemas específicos

- ¿Cuál es el efecto del cipionato de estradiol sobre el número de folículos de 2 a 4 mm, 4 a 8 mm, la calidad y cantidad de ovocitos en vacas Brown Swiss?
- ¿Cuál es el efecto del benzoato de estradiol el número de folículos de 2

a 4 mm, 4 a 8 mm, la calidad y cantidad de ovocitos en vacas Brown Swiss?

1.4 Justificación

1.4.1 Justificación social

Los problemas que afronta la ganadería en la región Junín son de diversa índole, esto se ve evidenciado por los bajos promedios de producción de leche y carne comparada con otras regiones. La presente investigación aborda el problema sobre la falta de aplicación de biotecnologías de impacto, a la par de otras regiones del país y a nivel Sudamérica, como también el impacto de estas tecnologías sobre el mejoramiento genético del ganado lechero y la mejora de sus parámetros productivos. Esto beneficiará a los ganaderos, ya que se generará y desarrollará en la región nuevas estrategias en el manejo reproductivo de los animales, y sobre todo permitirá conservar e incrementar el material genético de alto valor, además, posicionará al Valle del Mantaro como uno de los lugares a nivel nacional que va utilizando tecnologías de alto impacto.

1.4.2 Justificación teórica

En el Valle del Mantaro, el manejo reproductivo y productivo son muy pobres, escasamente en otras palabras. Esto se ve repercutido en el área de reproducción animal, por su baja tasa de preñez, o problemas en su concepción donde la repercusión económica es letal para el productor. Este mal manejo, donde influyen la interacción de otros factores, desencadena un pobre rendimiento reproductivo y productivo. Uno de esos factores es el de establecer un buen protocolo de sincronización de onda folicular que permita incrementar la cantidad y calidad de ovocitos con fines de fertilización in vitro. En la Región Junín los estudios referidos al uso de biotecnologías son nulos, lo que se pretende con la presente investigación es aplicar las biotecnologías reproductivas, dándoles a conocer a los ganaderos los protocolos de sincronización, uso de estrategias de manejo reproductivo, que nos dará avance al progreso genético.

1.4.3 Justificación metodológica

La presente investigación establece el uso de técnicas como el ovum pick up (OPU), una tecnología que no es usualmente usada a nivel del país debido a factores como personal altamente entrenado, materiales específicos y nivel de conocimiento de especialistas. El estudio permitirá implementar en primer lugar esta técnica y hacerla cotidiana adaptada a las condiciones del Valle del Mantaro y en segundo lugar aplicarla en beneficio de la población

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de dos tipos de estrógeno sobre la onda folicular para recolección de ovocitos *in vivo* en vacas Brown Swiss.

1.5.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto del cipionato de estradiol sobre el número de folículos de 2 a 4 mm, 4 a 8 mm, la calidad y cantidad de ovocitos en vacas Brown Swiss.
- Determinar el efecto del benzoato de estradiol sobre el número de folículos de 2 a 4 mm, 4 a 8 mm, la calidad y cantidad de ovocitos en vacas Brown Swiss.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de Investigación

2.1.1 A nivel internacional

De Roover et al. (7) concluyo un número similar de folículos (4.5 ± 2.6) mayor a 4mm en vacas de carne sincronizadas con progestágenos y estradiol, por otro lado, en vacas Holstein el número de folículos es de 1.8 ± 0.3 (Pérez, 2003).

Según Pérez (5), presento un trabajo que tuvo como objeto de estudio el número de folículos ($>5\text{mm}$), numero de ovocitos, tasas de recuperación, de diámetro para OPU, es considerablemente baja en vacas post parto en raza de carne (2.0 ± 0.3 y leche (1.8 ± 0.3), reduciendo la probabilidad de obtener un blastocisto producido in vitro. El grupo de tratamiento tuvo significativamente ($P < 0.05$). Por lo cual se llegó a la conclusión donde la respuesta hipofisaria fue mayor cuando la prueba de GnRH fue mayor administrados a las vacas en el día 30 posparto.

Matthiesen (8), condujo un estudio para evaluar el efecto de la inclusión de FSH para sincronizar la onda folicular encontrando que la superestimulación de FSH aumentó significativamente el número de folículos aspirados ($P < 0,001$) y los ovocitos recuperados ($P < 0,001$) en comparación con los donantes no superestimulados. El tamaño del folículo se cambió a folículos menos pequeños y más medianos y grandes. Además, hubo un marcado efecto positivo de la superestimulación de FSH sobre la escisión y las tasas de blastocistos en todas las clases de edad ($P < 0,001$). Es importante destacar que el déficit de desarrollo de los ovocitos de las novillas después de la MIV fue rescatado por el tratamiento con FSH y la maduración in vivo.

Looney et al. (9) utilizando estímulo hormonal durante las 72 horas que antes de la punción folicular, observaron que las novillas con menos de 8 meses de edad no produjeron embriones. Sin embargo, cuando los autores

utilizaron las novillas de más de 8 meses de edad (edad que alcanzaron la pubertad), fue posible obtener una producción del 19% de blastocistos. Esta diferencia de producción in vitro de blastocistos entre novillas puede estar relacionada con el crecimiento y maduración incompleta de los ovocitos obtenidos en estas novillas.

Silva et al., (10) en un estudio realizado cuyo objetivo fue comparar el uso de benzoato y cipionato de estradiol en vacas Girolando sometidas a inseminación a tiempo fijo. Se evaluaron la tasa de ovulación, diámetro del folículo dominante, tasa de concepción y tasa de sincronización. A pesar de que los parámetros fueron ligeramente superiores con cipionato de estradiol, estadísticamente se concluye que ambas fuentes de estrógeno fueron eficaces.

Ayala et al., (42) en un estudio de control de la emergencia de la onda folicular, que se realizó en Ecuador, donde utilizaron el benzoato de estradiol para poder observar cuan efectivo es en la sincronización de celo, para ello utilizaron nueve animales, en condiciones corporales y peso que era de 427.7 ± 23.0 kg, condición corporal de 2.7 ± 0.1 . antes del experimento se tuvo tres tratamientos, T1= BE 2mg; T2=0.25 mg de Gonadorelina; T3= Ablación de folículos > 5mm. Se inició una valoración transrectal, con sonda cervical de 7.5 MHz cada 24 horas, durante cinco días. Se aplicó un tratamiento estadístico de 3x3. Entonces se llegó a la conclusión de que el uso de benzoato estradiol causa el reinicio temprano de la onda folicular.

Los folículos que fueron recuperados tienen un promedio de reclutación en la nueva onda folicular que fue semejantes a los expuesto por Chasombat et al. (43), quienes contabilizaron 10.5 ± 0.1 folículos en ganado criollo tailandés y Ayala et al. (44) de 9.9 ± 1.5 folículos en vaquillas criollas en el altiplano ecuatoriano.

Floriani, (45) El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del benzoato de estradiol (BE) y la progesterona (norgestomet) en la dinámica folicular de las novillas aspiradas cada siete días, sincronizando el progreso de la onda folicular, número de folículos y la calidad de los ovocitos. Se trabajó

con vaquillas mestizas Simental x Nelore. Las vaquillas del tratamiento BE recibieron 2 mg de BE im después de la aspiración. En el Experimento 3 (n = 15), las vaquillas se sincronizaron con 2 mg de BE e implante de progesterona intravaginal (DIB) durante siete días, seguido de administración de PGF2. Se aspiraron todos los folículos mayores de 3 mm de diámetro, seguido de la administración de PGF2 el día siete. Además de no aumentar el número y la calidad de los ovocitos recuperados. Este estudio no demostró el efecto positivo de la aspiración folicular inmediatamente después de la emergencia de la onda folicular. Además, el uso de BE asociado a un dispositivo de progesterona, 12 h o 24 h antes de la aspiración folicular perjudico en la producción de embriones in vitro, en un programa de aspiración con intervalo siete días entre sesiones.

2.1.2 A nivel nacional

Quispe et al (11), desarrollo un estudio para evaluar el efecto de dos protocolos hormonales sobre la tasa de recuperación de ovocitos. Los resultados de la investigación reflejaron que hubo diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en el número de folículos de 2 a 4 mm (7.7 y 4.4) para los grupos BE y GnRH, respectivamente, además para folículos de 4 a 8 mm (3.7 y 2.4) y para folículos mayores a 8 mm no se hallaron diferencias ($P \leq 0,05$). En conclusión, la sincronización de la onda folicular en vacas post parto utilizando BE en lugar de GnRH, incrementa el desarrollo de un mayor número de folículos entre 2 a 4 mm, ideales para aspiración folicular.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Antecedentes de la colección de ovocitos guiada por ultrasonografía

La producción in vitro (PIV) que se remonta desde 1970, son una de las biotecnologías reproductivas que tiene mucho énfasis de enfoque veterinario y zootécnico, puesto con el nacimiento del primer ternero que nació en 1982, la técnica PIV comenzó a ser introducida y reconocida a nivel mundial, pero restringida en el campo de la experimentación, además que los índices de producción in vitro no superan la producción natural de las vacas, por las pocas o bajas tasas de viabilidad que tiene la misma.(12)

Los procedimientos para la producción in vitro, tienen secuencias que es

maduración in vitro, fertilización in vitro, cultivo de embriones es en esta etapa que al tener ingreso a la capa protectora de los embriones pues se contaminan los blastómeros y no son viables, es por ello la baja tasa de producción in vitro, lo cual requiere de investigación para mejorar los conocimientos (13)

La aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido para la recuperación de ovocitos bovinos fue originalmente establecida por Pieterse et al. (15). Desde entonces, la técnica de ovum pick up (OPU) supera algunas desventajas de la superovulación y uso de ovarios obtenidos después del sacrificio, combinado con la producción de embriones in vitro (FIV), ha de convertirse en un campo intenso por su potencial comercial.

Una de las ventajas del OPU es que es más flexible y repetible. La técnica para producir embriones de casi cualquier vaca viva puede ser utilizada en ganado de alto valor genético para la obtención de ovocitos valiosos. La aplicación de la técnica para los terneros juveniles puede acelerar aún más la ganancia genética al disminuir sustancialmente el intervalo de generación. También se adapta a bovinos con enfermedades del tracto genital o baja sensibilidad a un protocolo de superovulación.

Se han probado varios esquemas diferentes para OPU, en general, se pueden dividir en una vez por semana o dos veces semanales según el intervalo entre colectas. Durante ciertos períodos cortos, se pueden obtener más ovocitos con colectas dos veces por semana, pero para OPU a largo plazo, la frecuencia de aspiración más adecuada es una vez por semana (16, 17). Sin embargo, colectas de una vez por semana por mucho tiempo pueden causar ciertos efectos secundarios en las donantes de ovocitos. Se sugiere que si la aspiración folicular está restringida a los días 0-12 del ciclo estral, la influencia de la punción folicular sobre la dinámica ovárica posterior podría estar disminuida o abolida. (18)

2.2.2 Dinámica de la onda folicular del ovario

Se menciona que los Bos taurus llegan a presentar entre 2 a 3 ondas foliculares, en el Bos indicus llegan a tener 4 ondas foliculares, este proceso maravilloso de la naturaleza permite que la hembra se prepare para la concepción del nuevo ser, empieza con la etapa de reclutamiento, que en el

caso de las vacas van reclutarse entre 5-10 folículos, todo ello gracias a la acción hormonal que es de la activación FHS, ya en esta etapa todos los folículos tienen la capacidad de poder ser fertilizados, llega la etapa la selección donde a causa hormonal del LH un solo folículo llega a ovular para poderse fertilizar. Conocer este proceso es vital, ya que al mantenerse el folículo dominante no permite que los demás folículos maduren (19).

En todas las especies suscita la misma secuencia, claro con diferentes cantidades de ondas foliculares, por ello la principal hormona que van actuar para el inicio de la onda folicular y su maduración, dominancia es el FSH y LH (20).

2.2.3 Búsqueda y clasificación de COCs

La búsqueda de ovocitos se debe realizar parecida al de los embriones, bajo una lupa estereoscópica (30X) (21), se puede determinar si el ovocito posee el potencial para madurar y fecundar in vitro mediante la morfología del citoplasma y las células del cúmulo. (22) Se señala que la calidad intrínseca de los ovocitos está ligado a la eficiencia de la producción de embriones in vitro. Así también, Lonergan et al., (22) detallan que la prueba final de la calidad de un ovocito es su habilidad para estar fertilizado y llegar a desarrollarse hasta la etapa del blastocito, siendo apto y establecer una gestación, así finalmente producir a un ternero vivo. A continuación, se muestra la Tabla 1, donde se realiza la clasificación de los ovocitos según su morfología.

Tabla 1: Clasificación de la calidad de los ovocitos Blondin y Sirad, (23).

Tipo A	Ovocito inmaduro rodeado completamente de células del cúmulo, citoplasma homogéneo.
Tipo B	Ovocito inmaduro rodeado parcialmente de células del cúmulo, con citoplasma homogéneo.
Tipo C	Ovocito inmaduro con pocas células del cumulo, con citoplasma homogéneo.
Tipo D	Ovocito maduro, sin células del cumulo y con el citoplasma homogéneo.

Para Martinez, (24) la calidad del ovocito es determinante en el porcentaje

de fertilización obteniendo con ovocitos de calidad A, 59.4% y calidad B, 44% de fertilización, mientras que en los ovocitos de calidad C, 21,7% y D 9,5%.

2.2.4 Factores que afectan la colección de ovocitos

Para obtener más ovocitos del donante es necesario tener más folículos en el ovario bovino, que está influenciado por la raza, estado nutricional y condiciones climáticas. Las razas presentan diferentes números de folículos en los ovarios en un ciclo folicular, hay evidencia que las razas Bos indicus tienden a tener más ondas foliculares y una mayor población de folículos pequeños (<5mm) en comparación con las razas Bos taurus (25). Hay vacas con muchos folículos con promedios que oscilan entre 18 y 25 ovocitos recuperados por OPU por sesión sin el uso de hormonas exógenas o sincronización de onda. El efecto del estado nutricional en la reproducción animal y el desarrollo folicular es obvio De la Isla et al, (26). Los investigadores han demostrado que la temperatura del clima juega un papel clave en la formación de folículos bovinos, la calidad de ovocitos y desarrollo embrionario. El estrés calórico suprime el desarrollo folicular, lo que resulta en una serie de cambios en el crecimiento folicular Wolfenson et al, (27). Zeron et al. 2001 informaron que el número de folículos de 3 a 8 mm de diámetro por ovario fue mayor en invierno (19.6) en comparación con verano (12.0) y 7.5 ovocitos por ovario se encontraron en invierno y 5.0 ovocitos por ovario en verano después de la aspiración de folículos Zeron et al (28).

Además, en el procedimiento de OPU la experiencia del operador, la variación (edad, fase reproductiva y respuesta individual) son los factores importantes que afectan el éxito de la OPU y la calidad de los ovocitos. Además, la estimulación hormonal, la frecuencia de aspiración, una vez a la semana y dos veces a la semana son factores no menos importantes. Un operador experimentado ejerce la buena presión de vacío, el diámetro de la aguja, el tiempo de operación y aspiración también son factores a tomar muy en cuenta. Manik et al, (29).

2.2.5 Métodos empleados para la colección de ovocitos

a) *Obtención de ovocitos provenientes de camal*

Se obtiene a partir de hembras sacrificadas en el camal, se realiza la aspiración de los folículos con ayuda de jeringas y aguja nº18, se clasifica y solo se recoge los folículos que tienen diámetro folicular de 3-6mm (13).

El uso de esta técnica nos produce costo excesivo, por ello con el uso de esta técnica para la obtención de folículos, podemos también realizar proyectos de criopreservación, fertilización, producción in vitro, esto sería darle el aprovechamiento de hembras que fueron altamente productivas, pero el tiempo de producción han bajado y están descartadas. (30). Es de útil ayuda, no es la única técnica que se puede utilizar para la preservación de ovarios existen técnicas como slicing, corte, que también nos ayuda en conseguir folículos para uso de investigación. (31)

De los folículos encontrados podemos producir embriones, para ellos tiene que pasar por la etapa de maduración, fertilización y producción de embriones, en el encuentro de estos folículos podemos encontrar desde 15-20 óvulos, esto puede variar según la etapa estral que se encuentre la vaca, en otras podemos encontrar menores de 8, su transporte tiene que ser rápido y en menor de 3 horas, transportarlo con solución fisiológica o suero PBS, después se realiza la evaluación del diámetro folicular y los cúmulos oophorus para su posterior viabilidad d o descarte (32).

b) *Obtención de ovocitos mediante la técnica de ovum pick up*

En la actualidad, la recuperación de ovocitos de hembras vivas por punción transvaginal guiada ecográficamente (Ovum Pick-Up; OPU) y su posterior maduración, fecundación y cultivo in vitro permite la producción de embriones que pueden ser criopreservados o bien transferidos a hembras receptoras. (31). Esta técnica permite recoger ovocitos en las hembras de más de seis meses de edad, durante los primeros tres meses de gestación y a partir de las 2-3 semanas del postparto, por lo que no interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de las hembras donantes. En el caso de hembras muy jóvenes (menos de seis meses de edad) es necesario recurrir a la

laparoscopia. (13). La recolección de ovocitos de animales vivos permite incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora al año, obtenidos por procedimientos in vitro, además permite la disminución del intervalo generacional y ayuda a establecer esquemas que permitan incrementar la eficiencia productiva. La aspiración folicular se puede realizar en el mismo animal durante 5-6 meses y una periodicidad de dos aspiraciones por semana o una semanal, sin ningún efecto secundario sobre la reproducción o el bienestar animal.

Además, la OPU se puede aplicar durante los primeros tres meses de gestación a novillas o vacas y a novillonas pre púberes con lo que se logra hacer menor el intervalo generacional. La OPU-FIV logra obtener embriones de hembras con problemas de infertilidad o mala respuesta a los tratamientos superovulatorios. Se ha concluido que al final del periodo de aspiraciones, los animales pueden retornar a sus ciclos estrales normales y continuar con sus programas de cría. La viabilidad de los embriones producidos a partir de los ovocitos obtenidos por aspiración es similar a la alcanzada por embriones producidos por otros procedimientos in vitro, pero un poco más baja que la obtenida para embriones obtenidos por lavado, obteniéndose porcentajes de preñez que varían desde un 25-45 %. (30).

2.2.6 Uso de hormonas para la sincronización de la onda folicular

Se ha estudiado varios protocolos de estimulación ovárica, con el uso de gonadotropinas (FSH, PMSG o eCG y r-bST), con el fin de aumentar la eficiencia de esta técnica (33, 34). Las ventajas de la estimulación folicular parecen obvias, más folículos resultan en más ovocitos (34) sin embargo, hay muchos conflictos sobre esta práctica. A pesar de que los protocolos pre-aspiración promueven aumento de tamaño de los ovarios, haciendo más fácil su manipulación. Se sugiere que los folículos con diámetros mayores producidos por estos protocolos podrían inducir una menor eficiencia de la recuperación oocitaria debido a los siguientes aspectos: mayor presión intrafolicular, fluido folicular más viscoso y en mayor cantidad, lo que dificulta la aspiración de los mismos (35).

Los protocolos pre aspiración también fueron desarrollados con el objetivo de controlar la onda de crecimiento folicular. Entre las formas de control del crecimiento folicular, el tratamiento con progesterona y estradiol ha sido eficaz para promover la atresia de los folículos en desarrollo y la emergencia de una nueva onda folicular de 3 a 5 días después, debido a la acción inhibitoria de estas dos hormonas sobre el FSH (36, 37). A través de la administración de 2 mg de benzoato de estradiol y 50 mg de progesterona en el momento de la inserción del implante de progestágeno fue posible observar la emergencia de una nueva onda folicular, en promedio 4 días (38, 39). Además, sólo la aspiración folicular también puede controlar el crecimiento folicular, promoviendo la emergencia de una nueva onda folicular después de 1 a 2 días.

Aunque los implantes de progestágenos son bastante utilizados en protocolos previos a la aspiración folicular, el corto período de utilización de los mismos permite el cuestionamiento de su necesidad. Otro aspecto importante se refiere a la aplicación de PGF 2α previamente a la aspiración, con el fin de evitar la presencia de cuerpo lúteo en el momento de la aspiración folicular, facilitando de esta manera la manipulación de los ovarios (35).

2.3 Marco Conceptual

2.3.1 Calidad de ovocitos

De acuerdo a la Sociedad internacional de transferencia de embriones IETS (2011) la calidad de los ovocitos está determinada en cuatro categorías: A, B, C y D. Los criterios de clasificación están mediados por la integridad de la membrana plasmática y la integridad del cúmulo que rodea a cada célula.

2.3.2 Cantidad de ovocitos

La cantidad de ovocitos es establecida por el número de células recolectadas en una sesión.

2.3.3 Folículo ovárico

El folículo ovárico es un saco pequeño lleno de líquido, que contiene un ovulo inmaduro y se ubica en el ovario.

CAPITULO III

HIPOTESIS

3.1 Hipótesis General

H1 = Existe efecto de la aplicación de benzoato de estradiol y cipionato de estradiol sobre la onda folicular para recolección de ovocitos *in vivo* en vacas Brown Swiss.

H0 = No existen efecto de la aplicación de benzoato de estradiol y cipionato de estradiol sobre la onda folicular para recolección de ovocitos *in vivo* en vacas Brown Swiss.

3.2 Hipótesis Especificas

- a) **H1**: Existe efecto del cipionato de estradiol sobre el número de folículos de 2 a 4 mm, 4 a 8 mm, la calidad y cantidad de ovocitos en vacas Brown Swiss.
- b) **H0**: No existe efecto del cipionato de estradiol sobre el número de folículos de 2 a 4 mm, 4 a 8 mm, la calidad y cantidad de ovocitos en vacas Brown Swiss.
- c) **H1**: Existe efecto del benzoato de estradiol sobre el número de folículos de 2 a 4 mm, 4 a 8 mm, la calidad y cantidad de ovocitos en vacas Brown Swiss.
- d) **H0**: No existe efecto del benzoato de estradiol sobre el número de folículos de 2 a 4 mm, 4 a 8 mm, la calidad y cantidad de ovocitos en vacas Brown Swiss.

3.3 Variables

3.3.1 Variable independiente

Cipionato de estradiol
Benzoato de estradiol

3.3.2 Variable dependiente

Número de folículos de 2 a 4 mm
Número de folículos de 4 a 8 mm
Calidad de ovocitos
Cantidad de ovocitos

3.3.3 Operacionalización de variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	INSTRUMENTO	ESCALA
NÚMERO DE FOLICULOS DE 2 A 4 MM	Cuantitativa continua	Estructura en cuyo interior se da el crecimiento y maduración del ovulo. Contiene liquido folicular.	2 a 4 mm	Milímetros	Ecógrafo	Ordinal
NÚMERO DE FOLICULOS DE 4 A 8 MM	Cuantitativa continua	Estructura en cuyo interior se da el crecimiento y maduración del ovulo. Contiene liquido folicular.	4 a 8 mm	milímetros	Ecógrafo	Ordinal
CALIDAD DE OVOCITOS	Cualitativa jerárquica	Célula en estado morfológico adecuado para la maduración (40).	A, B, C, D	Membrana plasmática y el cúmulo que rodea a la célula deben estar íntegros.	Estereoscopio	Nominal
CANTIDAD DE OVOCITOS	Cuantitativa continua	La cantidad de ovocitos es establecida por el número de células recolectadas en una sesión	Numérica	Numérica	Estereoscopio	Ordinal
TOTAL DE OVOCITOS RECUPERADOS	Cuantitativa continua	La tasa de recuperación equivale al total de folículos presentes en el ovario sobre el número de ovocitos recuperados por sesión multiplicado por 100.	Numérica	Numérica	Calculadora	Ordinal

CAPITULO IV

METODOLOGÍA

4.1 Método de Investigación

El método general que se utilizó es el método científico debido a que la investigación que se realizó cumple con el procedimiento que sigue el conocimiento científico: planteamiento y formulación del problema, justificación, declaración de objetivos, elaboración del marco teórico, enunciación de hipótesis y su posterior verificación.

El enfoque del trabajo fue cuantitativo, descriptivo y se utilizó el método hipotético descriptivo.

Así mismo no se utilizó los métodos específicos como el de deducción y el de análisis síntesis para fundamentar los resultados, conclusiones, discusiones y sugerencias.

4.2 Tipo de Investigación

Investigación aplicada debido a que busca generar conocimiento con un propósito práctico, procura que el conocimiento producido favorezca la solución de un problema en una situación dada. Además, es de orden transversal – prospectivo. (41)

4.3 Nivel de Investigación

La presente investigación se ubicó en el nivel explicativo (experimental), el cual está dirigido a comprobar la relación causa efecto entre las variables. En esta investigación se analizó los efectos que produce el cipionato de estradiol y el benzoato de estradiol sobre el número de folículos, cantidad de ovocitos, calidad de ovocitos y la tasa de recuperación de ovocitos en vacas Brown Swiss.

4.4 Diseño de la Investigación

El diseño del estudio es cuasi experimental, con el siguiente modelo:

$M1C \dots O_1 \rightarrow X \rightarrow O_2$

$M2C \dots O_1 \rightarrow \rightarrow O_2$

Donde:

$M1C =$ Grupo muestral 1

$M2C =$ Grupo muestral 2

$O_1 =$ Observaciones antes de la intervención

$O_2 =$ Observaciones después de la intervención

$X =$ Intervención o tratamiento

4.5 Población y Muestra

4.5.1 Población

La población estuvo constituida por todas las vacas de la raza Brown Swiss en lactación de la estación experimental el Mantaro, perteneciente a la Universidad Nacional del Centro del Perú.

4.5.2 Muestra y tipo de muestreo

La muestra que se trabajó fue de tipo no probabilístico intencionado por conveniencia, donde se consideró 7 vacas libres de enfermedades en etapa de lactación.

Criterios de inclusión

Vacas en lactación entre 1 a 4 partos de raza Brown Swiss sin problemas sanitarios y en el primer tercio de lactación.

Criterios de exclusión

Vacas en seca

Vacas de raza diferente a la mencionada

Vacas con problemas sanitarios y reproductivos

4.6 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

4.6.1 Técnica de investigación

La observación es la técnica de investigación básica, sobre la que se sustentan todas las demás, ya que establece la relación básica entre el sujeto que observa y el objeto que es observado, que es el inicio de toda comprensión de la realidad. (Según Bunge)

Se utilizó esta técnica, ya que los grupos requieren observación y vigilancia de los tratamientos por parte del investigador.

4.6.2 Instrumento de investigación

El fichaje es un método para recolectar y almacenar información. Estas fichas son importantes para el estudio ya que permite registrar datos o información. (Mildred Dacosta). Es en ese contexto que se usan las fichas de recolección de datos únicamente para consignar las variables e identificar los animales por tratamiento.

Para esta investigación se utilizaron fichas de recolección de datos para el campo y el laboratorio.

4.6.3 Selección y distribución

Se eligieron un total de 7 vacas en lactación de 1 a 4 partos, en el primer tercio de lactación, las cuales fueron distribuidos al azar para los tratamientos.

4.6.4 Técnicas específicas

Sincronización de onda folicular (aplicación de los tratamientos)

Los tratamientos fueron asignados al azar y se formaron dos grupos de animales. El primer grupo de BE(n=7), al día “0” se insertó un dispositivo intravaginal DIB (0.6gr de progesterona, Syntex®, Argentina), aplicó (i.m.) 1.2 mg de BE (Estrovet®, Montana) y 0.524 mg de cloprostenol sódico (Lutaprost ®, AgrovvetMarket). El segundo grupo de Cipionato de Estradiol (n=7), al día “0” se insertó un dispositivo intravaginal DIB, aplicará (i.m.) 1.2 mg de Cipionato de estradiol y 0.524 mg de cloprostenol sódico. A los dos grupos de animales se realizó ecografía intravaginal (ECO) al día 0 y 4 para evaluar la dinámica folicular y crecimiento de folículos post tratamiento hormonal. Para la toma de imágenes de utilizó un ecógrafo DP – 50 vet (Esaote®, Holanda) con transductor micro convexo a una frecuencia de 7.5 MHZ vía transvaginal con una guía de aspiración folicular (WTA®, Brasil). Las variables en evaluación son conteo de número de folículos de 2 a 4 mm, 4 a 8 mm y mayores de 8mm de diámetro y la cantidad y calidad de ovocitos.

Colección de Ovocitos mediante técnica ovum pick up

En primer lugar, se administra anestesia vía epidural, para disminuir los

esfuerzos expulsivos y facilitar la manipulación del ovario.

Luego se realiza el vaciamiento manual del recto, limpieza y desinfección de la vulva y el área perineal

Posteriormente se introduce el transductor en la vagina, convenientemente lubricado y protegido por una cubierta sanitaria de látex. Se realiza la sujeción del ovario (mano izquierda) y manejo del mango de OPU (mano derecha).

Para visualizar los folículos ováricos, se emplea un ecógrafo equipado con una sonda transvaginal de 5-7'5 MHz y una guía de aspiración, mango de OPU de 60 cm de longitud, donde se coloca la guía de punción. Por la guía se introduce una aguja de punción desechable (18 G, 0'9 x 70mm) conectada a un tubo estéril de 50 ml mediante una conducción de Teflón. El equipo de OPU se completa con una bomba de vacío accionada por pedal con la que se aplica una aspiración constante de 75 mm Hg.

Los ovarios se posicionan vía rectal delante de la sonda para observar folículos entre 2 – 8 mm de diámetro. Antes de iniciar la sesión de punción se drena el sistema aspirando una pequeña cantidad de medio de recojo. Tras la aspiración de cada 3-4 folículos se realiza un lavado exhaustivo del fluido folicular en la aguja de aspiración y en el sistema de recolección con medio de lavado y recogida [PBS suplementado con heparina sódica (2'2 UI/ml) y suero fetal bovino (1%)].

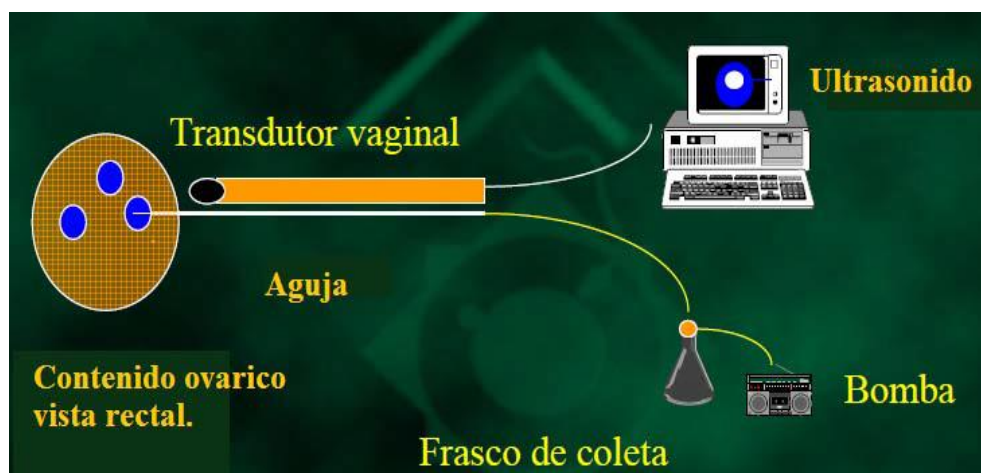


Figura 1: Esquema de la colección de ovocitos con la técnica de Ovum Pick Up.

Búsqueda y clasificación de ovocitos

Luego de la colección, los tubos cónicos de 50 ml (Falcon ®) con el líquido folicular recolectado, son trasladados al laboratorio, tratando en todo momento de mantener la temperatura. En el laboratorio se inicia el proceso con un filtro de 100 µm de diámetro, con el objetivo de separar los ovocitos y las células del cúmulo de los demás restos celulares y sangre. Posterior a esto, se traslada el líquido filtrado a un microscopio estereoscopio a 20x, para visualizar los complejos ovocitos – cúmulos (COCs), una vez identificados son trasladados a una placa de 35 x 10 mm (Falcon ® 1008) con medio H-199® (Vitrogen, Brasil). Los COCs serán observados a 40x y posteriormente evaluados por su morfología para clasificarlos dentro de 4 categorías (De Loos et al., 1989):

(A) completamente rodeados por ≥ 3 capas células del cúmulo con citoplasma homogéneo.

(B) ovocitos parcialmente por células del cúmulo y citoplasma irregular.

(C) ovocitos desnudos

(D) ovocitos rodeados por fibrina, con aspecto de tela de araña.

Definiéndose los COCs como viables (calidad A y B) y no viables (calidad C y D) para los objetivos de la investigación.

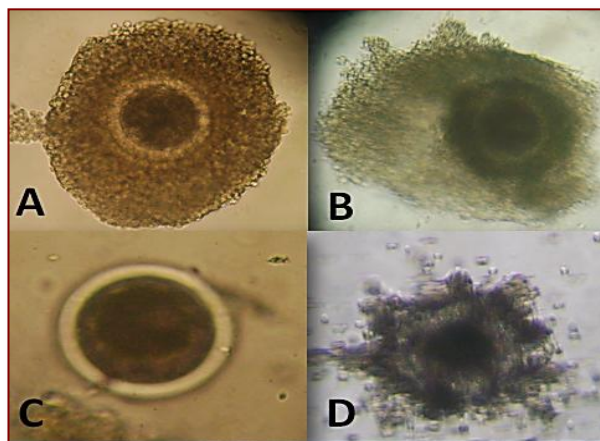


Figura 2: Calidades de ovocitos

4.7 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

Durante la investigación se realizó un experimento con manipulación de las variables, para luego llegar a conjeturas o inferencias y así determinar su

comportamiento. Por este motivo, se utilizó el método es deductivo.

4.7.1 Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva en primera instancia. Posteriormente para verificar la distribución de los datos, se realizó una prueba de normalidad. Para establecer las diferencias entre los tratamientos y entre grupos de vacas, de acuerdo a las variables cuantitativas se utilizó un diseño de bloques del todo al azar con error de muestreo. El paquete estadístico que se utilizó fue el SAS 9.0.

El modelo aditivo es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + B_j + t*b_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} : es la variable de respuesta

μ : es la media global

t_i : es el efecto de la i-ésimo tipo de estrógeno.

B_j : es el efecto de la j-ésima vaca.

$t*b_{ij}$: es el efecto de la i-ésimo tipo de estrógeno dentro de cada vaca

ϵ_{ijk} : error asociado de la i-ésimo tipo de estrógeno de la j-ésima vaca de la k-esima repetición.

4.8 Aspectos Éticos de la Investigación

La investigación se rigió al reglamento sobre aspectos éticos de La Universidad Peruana Los Andes, detallados a continuación:

- La presente investigación respeto la Ley 30407, ley de protección de animal. Durante el proceso de investigación no se evidencio maltrato ni perjuicio a ningún animal, por ende, en todo momento se evitó generar daños a el ecosistema y la naturaleza.
- La Universidad Peruana Los Andes mediante el Reglamento General de Investigación, Reglamento del Comité de Ética en Investigación, Código de Ética para la Investigación Científica especifican los principios y normas de comportamiento y ética que cumplió la investigadora durante todo el proceso de investigación.
- En relación a estas normas, se menciona que en ningún momento hubo un plagio de los componentes del documento, ni de la idea de investigación. Por

ende, se señala que la presente investigación es original y basada en el rigor científico. Por otro lado, durante el proceso de investigación no hubo conflictos de intereses y nos acatamos a las normas institucionales. La investigación se realizó con la mayor responsabilidad, se cumplió con la confidencialidad del caso y se reportan los resultados de manera abierta.

- La investigación previno cualquier tipo de daño y no hubo daño alguno a un ser vivo, y se respetaron los principios de responsabilidad y veracidad. Por ende, al término de la investigación se pone al descubierto los resultados veraces y objetivos, conservando así la reputación de la institución.
- Siendo que se trabajó con animales de establo lechero, se necesitó la autorización informada para realizar la presente investigación.

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1 Descripción de Resultados

La tabla 2 describe los efectos de los dos tratamientos (benzoato de estradiol y cipionato de estradiol) sobre el reclutamiento de folículos de diferentes tamaños, cabe mencionar que para fines de fertilización in vitro folículos entre 2 a 4 mm son adecuados, en segunda instancia folículos de 4 a 8 mm debido a que estos presentan ovocitos que pueden ser madurados in vitro, folículos de 8 a más de diámetro no son adecuados. No se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre los tratamientos aplicados sobre las variables presentadas, lo que quiere decir que ambos tipos de estrógeno tienen similares efectos sobre la onda folicular en relación al número de folículos reclutados a pesar de una ligera diferencia numérica a favor del tratamiento con cipionato de estradiol. Todas las variables que se presentan en la tabla 2 tuvieron una normalidad de sus datos excepto la variable folículos mayores a 8 mm, la evidencias se presentan en la sección de anexos.

Tabla 2: Efecto de los tratamientos con benzoato de estradiol y cipionato de estradiol sobre la cantidad de folículos de diferentes diámetros y el número total de folículos recuperados por aspiración folicular.

Tratamiento	Repeticiones	Variables			
		Folículos 2-4 mm	Folículos 4-8 mm	Folículos > a 8 mm	Número total de folículos
Cipionato de estradiol	21	5.66 ± 2.71^a	3.52 ± 2.06^a	0.66 ± 0.45^a	9.80 ± 3.15^a
Benzoato de estradiol	21	6.42 ± 3.01^a	2.80 ± 2.45^a	0.38 ± 0.51^a	9.38 ± 3.05^a

*^a Cada letra indica diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

La tabla 3 describe las diferencias entre las vacas incluidas en el estudio en ambos tratamientos, se evidencian ligeras diferencias ($p < 0.05$) entre las vacas evaluadas para las variables folículos de 2 a 4 mm, folículos de 4 a 8 mm y número total de folículos, por otro lado, no hubo diferencias para la variable folículos de 8 a más

mm de diámetro. Las diferencias encontradas fueron entre al menos 2 a 3 vacas para cada variable, esto implica que fisiológicamente hay un efecto de las vacas sobre las variables a pesar de los tratamientos aplicados.

Tabla 3: Evaluación de las diferencias entre las vacas incluidas en el estudio para ambos tratamientos y en relación a las variables de cantidad.

Tratamiento	Repeticiones	Variables			
		Folículos 2-4 mm	Folículos 4-8 mm	Folículos > a 8 mm	Número total de folículos
Vaca 1	6	6.00 ± 2.71 ^{ab}	4.33 ± 1.06 ^a	0.50 ± 0.05 ^{ab}	10.83 ± 2.15 ^{ab}
Vaca 2	6	8.33 ± 1.98 ^a	4.16 ± 0.98 ^a	0.50 ± 0.07 ^{ab}	13.00 ± 3.05 ^a
Vaca 3	6	5.33 ± 2.01 ^{ab}	3.33 ± 1.01 ^a	1.00 ± 0.18 ^a	9.66 ± 2.08 ^{ab}
Vaca 4	6	8.16 ± 1.78 ^a	2.66 ± 0.77 ^a	0.16 ± 0.06 ^b	11.00 ± 3.12 ^{ab}
Vaca 5	6	4.83 ± 1.98 ^b	3.33 ± 0.87 ^a	0.16 ± 0.08 ^b	8.33 ± 2.44 ^b
Vaca 6	6	5.50 ± 1.04 ^{ab}	1.50 ± 0.56 ^a	0.66 ± 0.11 ^{ab}	7.66 ± 2.11 ^b
Vaca 7	6	4.16 ± 1.77 ^b	2.83 ± 1.09 ^a	0.66 ± 0.09 ^{ab}	6.66 ± 2.68 ^b

* ^{a b ab} Cada letra indica diferencias entre vacas (p<0.05).

En la tabla 4, se aprecia la acción de los tratamientos sobre las variables de calidad de ovocitos y el número total de ovocitos recuperados. Se hallaron diferencias (p<0.05), entre los tratamientos con respecto a la variable ovocitos no viables de calidad C y D que no son adecuados para fertilización in vitro, mientras que para las variables ovocitos viables que corresponden a la calidad A y B y al número total de ovocitos recuperados no se hallaron diferencias (p<0.05). Es probable que haya un efecto del cipionato de estradiol relativo a la viabilidad de los ovocitos recuperados en comparación al benzoato de estradiol. Cabe mencionar que también se aprecia que hubo una ligera ventaja en términos cuantitativos del tratamiento con cipionato de estradiol sobre el benzoato de estradiol.

Tabla 4: Efecto de los tratamientos con benzoato de estradiol y cipionato de estradiol sobre la calidad de ovocitos y el número total de ovocitos recuperados por aspiración folicular.

Tratamiento	Repeticiones	Variables		
		COCs Viables	COCs No Viables	Total Ovocitos Recuperados
Cipionato de estradiol	21	3.47 ± 1.93 ^a	1.09 ± 0.86 ^b	4.57 ± 2.12 ^a
Benzoato de estradiol	21	2.57 ± 1.84 ^a	1.85 ± 0.99 ^a	4.42 ± 2.78 ^a

*^a Cada letra indica diferencias entre tratamientos (p<0.05).

En relación a la tabla 5, presenta las diferencias entre las vacas incluidas en el estudio para ambos tratamientos y en relación a las variables de calidad de ovocitos viables y no viables, además del número total de ovocitos recuperados. Se evidencia que hay diferencias (p<0.05) entre las vacas para la variable ovocitos viables, esto probablemente debido al factor intrínseco de cada vaca, no se hallaron diferencias (p<0.05) entre las vacas para la variable ovocitos no viables y en relación a la variable ovocitos recuperados por vaca se hallaron diferencias (p<0.05), sin embargo, la recuperación de ovocitos está más relacionada a la destreza del operador que al factor fisiológico del animal.

Tabla 5: Evaluación de las diferencias entre las vacas incluidas en el estudio para ambos tratamientos y en relación a las variables de calidad.

Tratamiento	Repeticiones	Variables		
		COCs Viables	COCs No Viables	Total Ovocitos Recuperados
Vaca 1	6	3.16 ± 1.05 ^{ab}	1.50 ± 0.44 ^a	4.66 ± 2.03 ^{ab}
Vaca 2	6	4.50 ± 1.44 ^a	2.16 ± 0.67 ^a	6.66 ± 2.91 ^a

Vaca 3	6	2.83 ± 0.98 ^{ab}	1.50 ± 0.78 ^a	4.33 ± 1.99 ^{ab}
Vaca 4	6	4.16 ± 1.77 ^a	2.00 ± 0.81 ^a	6.16 ± 2.41 ^a
Vaca 5	6	2.66 ± 0.81 ^{ab}	1.00 ± 0.12 ^a	3.66 ± 1.88 ^b
Vaca 6	6	2.00 ± 0.69 ^b	1.00 ± 0.10 ^a	3.00 ± 1.62 ^b
Vaca 7	6	1.83 ± 0.13 ^b	1.16 ± 0.59 ^a	3.00 ± 1.11 ^b

* ^{a b ab} Cada letra indica diferencias entre vacas (p<0.05).

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El estudio involucró la evaluación del efecto de dos tipos de estrógeno (cipionato de estradiol y benzoato de estradiol) en el control de la onda folicular sobre las variables de calidad y cantidad de ovocitos recuperados mediante la técnica de ovum pick up en vacas en lactación de la raza Brown Swiss en condiciones del Valle del Mantaro. Se asume que ambos tipos de estrógenos tienen rutas diferentes en cuanto a su farmacodinamia y farmacocinética (33,34), lo que causaría efectos sobre el control de la onda folicular para la colecta de ovocitos con fines de fertilización in vitro. En biotecnología reproductiva hoy en día se busca generar mayor cantidad de folículos de un diámetro adecuado (2 a 4 mm) que permita la obtención de ovocitos de calidad y en cantidades suficientes para generar eficiencia en la productividad de embriones in vitro, tal como se realiza en otros países a gran escala. No hay reportes sobre el control de la onda folicular en vacas de la raza Brown Swiss y además bajo condiciones de altura, como son los sistemas de producción en el Valle del Mantaro. Los resultados encontrados en el presente estudio no evidenciaron diferencias entre los tratamientos aplicados en relación a las variables medidas, lo que indicaría que sincronizar con cipionato de estradiol y benzoato de estradiol, bajo las condiciones que el estudio presenta, tendrían los mismos efectos sobre calidad y cantidad de ovocitos.

Al respecto, Bó et al., (6), en un estudio encontró una mayor cantidad de folículos pequeños de diámetro (2 a 4 mm) en la mayoría de vacas tratadas con benzoato de estradiol (7.7) vs GnRH (4.4), corroborando que el estradiol es más eficiente en el reclutamiento folicular de vacas cíclicas; así mismo, la ausencia de cuerpo lúteo en el 86% de vacas del grupo benzoato de estradiol, puede favorecer al crecimiento uniforme de los folículos. Estos resultados pudieran estar relacionados con el presente estudio en lo que respecta al efecto del estrógeno sobre el control de la onda folicular, sin embargo, el promedio de ovocitos recuperados en nuestro estudio fue menor, además, no se midió la presencia de cuerpo lúteo.

En otros estudios desarrollados en ganado lechero, De Roover et al. (7) describió un número similar de folículos (4.5 ± 2.6) mayor a 4mm en vacas de carne sincronizadas con progestágenos y estradiol, sin embargo, en vacas Holstein el número de folículos es de 1.8 ± 0.3 (Pérez, 2003); lo que contrasta con el presente estudio, al haber evaluado animales en lactancia. Un estudio comparativo similar al nuestro, pero para evaluar variables relacionadas a la inseminación artificial fue desarrollado por Silva et al., (10)

cuyo objetivo fue comparar el uso de benzoato y cipionato de estradiol en vacas Girolando sometidas a inseminación a tiempo fijo, se evaluaron la tasa de ovulación, diámetro del folículo dominante, tasa de concepción y tasa de sincronización. A pesar de que los parámetros fueron ligeramente superiores con cipionato de estradiol, estadísticamente se concluye que ambas fuentes de estrógeno fueron eficaces. Esto también es congruente con nuestro estudio.

El único estudio nacional donde se evaluaron protocolos hormonales para el control de la onda folicular y posterior colecta de ovocitos para fertilización in vitro fue desarrollado por Quispe et al (11), que evaluó el efecto de dos protocolos hormonales sobre la tasa de recuperación de ovocitos, los resultados de este estudio detallan que hubo diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en el número de folículos de 2 a 4 mm (7.7 y 4.4) para los grupos BE y GnRH, respectivamente, además para folículos de 4 a 8 mm (3.7 y 2.4) y para folículos mayores a 8 mm no se hallaron diferencias ($P \leq 0,05$) para los mismos grupos. En termino, la sincronización de la onda folicular en vacas post parto utilizando benzoato de estradiol en lugar de GnRH propicia el desarrollo de un mayor número de folículos entre 2 a 4 mm, favorables para la aspiración folicular. Este resultado también es congruente con nuestro estudio.

Los resultados de esta investigación están afectados a factores adicionales, como son: fisiología de los animales, genética animal, manejo del establo, control de stress, manejo alimenticio, etc.

CONCLUSIONES

- ✓ Se concluye que el uso de estrógenos (cipionato de estradiol y benzoato de estradiol) para el control de la onda folicular y posterior obtención de ovocitos de calidad y cantidad, es eficiente independientemente del tipo de estrógeno aplicado.
- ✓ Las variables de calidad y cantidad medidas en el presente estudio fueron similares estadísticamente para los tratamientos de cipionato y benzoato de estradiol, sin embargo, hubo ligeras ventajas cuantitativas a favor del cipionato de estradiol en comparación al benzoato de estradiol, esto se contrasta con lo reportado con otros autores.

RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda utilizar fuentes de estrógeno para mejorar el control de la onda folicular con fines de recolección de ovocitos para fertilización in vitro independientemente de la fuente de estrógeno.
- ✓ Se recomienda difundir la técnica de colección de ovocitos por Ovum Pick Up entre los profesionales (médicos veterinarios, zootecnistas, técnicos, etc.) dedicados al mejoramiento genético del ganado vacuno y así optimizar los parámetros reproductivos en el Valle del Mantaro.
- ✓ Se recomienda implementar estudios similares, con otras fuentes hormonales como FSH, a diferentes días de sincronización y colecta, que permitan conocer el efecto de estos factores sobre las variables medidas.
- ✓ A las universidades y centros de estudio, se recomienda implementar capacitaciones permanentes sobre el manejo de estas tecnologías (Ovum Pick Up) y así poder contar con personal capacitado en la región para mejorar los parámetros reproductivos de la ganadería lechera.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. MUNAR C, MUJICA I, MARTIN E, IROULEGUY J, HUTER S, ALONSO H, ARZENO M, GOITIA O, FARNETANO N, ANCHORDOQUI J. Factors affecting efficiency of recipients herds in dairy and beef cattle operations. *Spermova* 2013; 1(1): 15 – 19.
2. GOSDEN R Y TELFER E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *Journal of Zoology*. Volume211, Issue1. January 1987. Pp 169-175. 1987.
3. SILVA-SANTOS K, SENEDA M. Multioocyte follicles in adult mammalian ovaries. *Anim Reprod* 8: 58-67. 2011.
4. GUERRA, R., SOLIS, A., SANDOYA, G., DE ARMAS, R., Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vivo e in vitro. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria* [Internet]. 2012;13(10): Recuperado de: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/63624631005>
5. PEREZ O. Oocyte production in the early postpartum cow. Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University. Requirements for the degree of Doctor of Philosophy. 2003. 152pp
6. BO, G.A., ADAMS, G.P., NASSER, L.F., PIERSON, R.A., MAPLETOFT, R.J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology*. 1993; 40, 225–239.
7. DE ROOVER R, JMN FEUGANG, PEJ BOLS, G GENICOT AND CHHANZEN. Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle in Vitro Embryo Production. *Reprod Dom Anim*. 2008: 1-7
8. MATTHIESEN M. Effect of donor age on the developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes obtained by repeated OPU from nonstimulated and FSH-superstimulated German Simmental heifers and cows at different life cycle stages. Tesis para obtener el doctorado veterinario. Facultad de Veterinaria de la Universidad Ludwig-Maximilians de Munich. 2011.
9. LOONEY, C.R., DAMIANI, P., LINDSEY, B.R., LONG, C.R., GONSETH, C.L.,JOHNSON, D.L., DUBY, R.T. Use of prepuberal heifers as oocytes donors for IVF: Effect of age and gonadotrophin treatment. *Theriogenology*, vol. 43, p. 269, 1995.

10. SILVA O, MELLO MR, SILENCIATO L, FERREIRA J, COUTO S, FAJARDO R, RESENDE O. Comparison of estradiol benzoate and cypionate in Girolando cows submitted to a timed artificial insemination. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* [Internet]. 10Oct.2019 [cited 5Dec.2019];56(3): e155078. Available from: <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/155078>
11. QUISPE C; J. MERCADO; E. FERNÁNDEZ; E. MIXAN; S. GAMARRA, E. MELLISHO. Efecto de tratamientos con benzoato de estradiol ó gnrh sobre la dinámica folicular para aspiración de folículos (ovum pick up) guiada por ultrasonido en vacas lecheras. *Spermova*. 2014; 4(1): 86 – 88. 2014.
12. PALMA, GA. *Biotecnología de la Reproducción*. Ediciones INTA S.A. México. 2001.
13. HERRADÓN, PG; QUINTELA, LA; BECERRA, JJ; RUIBAL, S; FERNÁNDEZ, M. In vitro fertilization: An alternative for genetic improvement in bovines. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* Vol. 15, Supl. 1, 5p. 2007.
14. MUCCI N., ALLER JF., KAISER GG., HOZBOR F., ALBERIO RH. Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch. Med. Vet.*, Vol. XXXVIII N° 2, 2006, 97-104p.
15. PIETERSE MC, KAPPEN KA, KRUIP TA AND TAVERNE MA . Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries *Theriogenology* 30 751–762. (1988).
16. PIETERSE M.C, VOS P.L.A.M, KRUIP TH. A.M., WURTH Y.A., VAN BENEDEM TH.H., WILLEMSE A.H., TAVERNE M.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, vol. 35, p.19-24, 1991.
17. LOONEY, C.R., LINDSEY, B.R., GONSETH, C.L., JOHNSON, D.L., Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows., *Theriogenology* v.41 p.73, 1994.
18. TAKENOUCI, N., Y. HIRAO, I. KOSUKE, M. SHIMIZU, M. GESHI AND T. NAGAI. The effect of inhibin immunization on the results of ovum pick up in Japanese Black cow. *Proc. 94th. Annual. Meet. Jap. Soc. Anim. Reprod.* 1:71. 2001.
19. ADAMS, G. P., R. L. MATTERI, J. P. KASTELIC, J. C. KO AND O. J. GINTHER. Association between surges of folliclestimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. 1992. *J. Reprod. Fertil.* 94:177-188.

20. DRIANCOURT M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in faro animals implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55: 1211-1239. (2001).
21. PELÁEZ, P. Producción in vitro de Embriones. Tesis Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad de Cuenca. Ecuador .74p. 2011.
22. LONERGAN, P; RIZOS, D; WARD, F; BOLAND, MP. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev.* 2001 Sep-Oct;41 (5):427-37p.
23. BLONDIN, P; SIRAD MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for development competence in bovine oocytes. *Mol.Reprod.Dev.* 41: 54- 62p. 1995.
24. MARTÍNEZ, YM. Análisis de la morfología ovocitaria en Bovina previa fecundación In Vitro. Tesis de Maestría en Biología y Tecnología de la Reproducción. Universidad de Oviedo.32p. 2013
25. SEGERSON EC, HANSEN TR, LIBBY DW, RANDEL RD, GETZ WR. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *J Anim Sci* 59: 1026-1046. (1984).
26. DE LA ISLA G, AYALA A, AKE R, GONZALEZ A. Effects of body condition change over oestrus, follicular development and ovulation rate in Pelibuey ewes under tropical conditions. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14: 337–347. 2011.
27. WOLFENSON D, ROTH Z, MEIDAN R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim Reprod Sci* 60-61: 535-547. (2000)
28. ZERON Y, OCHERETNY A, KEDAR O. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reprod* 121: 447-454. (2001).
29. MANIK RS, SINGLA SK, PALTA P. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. *Anim Reprod Sci* 76: 155-161. (2003)
30. HINCAPIÉ J, Memoria técnica curso de graduación: Preparación de las columnas de percoll. Honduras, 2010.
31. DÍEZ C. MUÑOZ M. CAAMAÑO JN. GÓMEZ E. Biotecnologías reproductivas: Producción y Criopreservación de embriones in Vitro. *Tecnología agroalimentaria.* [Web en línea]. [2010] [41-46pag]. Disponible en URL:

<http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4578>

32. GARDE J. LÓPEZ L. GALLEGO M. Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal. [1996]
33. BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; LEIN, A.; CORYN, M.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF program. *Theriogenology*, Stoneham, v. 49, n. 5, p. 983-995, 1998
34. DE ROOVER, R.; GENICOT, G.; LEONARD, S.; BOLS, P.; DESSY, F. Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 13-25, 2005.
35. SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 67, n. 1-2, p. 37-43, 2001.
36. BÓ, G. A.; COLAZO, M. G.; MARTÍNEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestaginos y diferentes ésteres de estradiol. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. Anais... Londrina: Ed. UEL, 2006. p. 71-84.
37. BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without progestogen implant. *Theriogenology*, Stoneham, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, 1994.
38. BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, Stoneham, v. 65, n. 1, p. 77-88, 2006.
39. MORENO, D.; CUTAIA, L.; VILLATA, M. L.; ORTISI, F.; BÓ, G. A. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*, Stoneham, v. 55, n. 1, p. 408, 2001.
40. IETS (International embryo transfer society). *Bovine in vivo ova tutorial*. 129 p. EEUU. (2010).
41. HERNANDEZ, R., FERNANDEZ, C., & BAPTISTA. *Metodología de la Investigación*; Sexta edición. Mexico D.F.: Mc. GRAW- HILL. (2014)

42. AYALA LUIS EDUARDO, NIETO ESCANDÓN PEDRO EMILIO, RODAS CARPIO ERMES RAMIRO, SARMIENTO QUITO SANTIAGO XAVIER, DUTÁN SANANGO JORGE BOLÍVAR. Control de la emergencia de la onda folicular mediante la aplicación de benzoato de estradiol, GnRH y ablación folicular en el metaestro tardío en vaquillas de trópico alto. *Rev Inv Vet Perú*; 31(4): 17009 – 2020
43. CHASOMBAT J, NAGAI T, PARNPAI R, VONGPRALUB T. Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native (*Bos indicus*) heifers. *Anim Sci J* 85: 15-24; 2013. doi: 10.1111/asj.12086
44. AYALA LE, PESANTEZ JL, RODAS ER, DUTÁN JB, CALLE JR, MURILLO YA, VÁZQUEZ JM. Dinámica folicular de vaquillas criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. *Arch Zootec* 68: 186-192; 2019. doi: 10.21071/az. v68i262.-4135.
45. FLORIANI RAMOS ALEXANDRE. Efeito de progestesterona e benzoato de estradiol na dinâmica folicular e produção in vitro de embriões bovinos. Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. 2006

ANEXOS

a) Matriz de Consistencia

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	TIPO, NIVEL Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	VARIABLES	DISEÑO METODOLOGICO
<p>PROBLEMA GENERAL</p> <p>¿Cuál será el efecto de dos tipos de estrógeno sobre la onda folicular para recolección de ovocitos in vivo en vacas Brown Swiss?</p> <p>PROBLEMAS ESPECÍFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuál será el efecto del cipionato de estradiol sobre la onda folicular para recolección de ovocitos in vivo en vacas Brown Swiss? • ¿Cuál será el efecto del benzoato de estradiol sobre la onda folicular para recolección de ovocitos in vivo en vacas Brown Swiss? 	<p>OBJETIVO GENERAL</p> <p>Determinar el efecto de dos tipos de estrógeno sobre la onda folicular para recolección de ovocitos in vivo en vacas Brown Swiss.</p> <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar el efecto del cipionato de estradiol sobre la onda folicular para recolección de ovocitos in vivo en vacas Brown Swiss. • Determinar el efecto del benzoato de estradiol sobre la onda folicular para recolección de ovocitos in vivo en vacas Brown Swiss. 	<p>TIPO DE INVESTIGACIÓN</p> <p>Aplicada de orden longitudinal – prospectivo</p> <p>NIVEL DE INVESTIGACIÓN</p> <p>Explicativo</p> <p>DISEÑO DE INVESTIGACIÓN</p> <p>Diseño pre experimental</p>	<p>a. VARIABLES</p> <ul style="list-style-type: none"> - Calidad de Ovocitos - Cantidad de ovocitos - Número de folículos 2 a 4 milímetros - Número de folículos de 5 a 8 milímetros - Tasa de recuperación de ovocitos 	<p>POBLACION</p> <p>La población son todas las vacas Brown Swiss en etapa de lactación que pertenecen al establo El Mantaro.</p> <p>MUESTRA</p> <p>10 vacas en primer tercio de lactación sin problemas reproductivos</p> <p>TÉCNICAS E INSTRUMENTOS</p> <p>Para la recolección de datos se utilizarán registros previamente elaborados para cada variable en campo y laboratorio.</p> <p>ANÁLISIS DE DATOS</p> <p>Estadística descriptiva, prueba de normalidad y prueba de contingencia para estimar las diferencias para las variables categóricas y un análisis de varianza mediante un diseño de bloques completamente al azar.</p>

b) Matriz de Operacionalización de Variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	INSTRUMENTO	ESCALA
NÚMERO DE FOLICULOS DE 2 A 4 MM	Cuantitativa continua	Estructura en cuyo interior se da el crecimiento y maduración del ovulo. Contiene liquido folicular.	2 a 4 mm	Milímetros	Ecógrafo	Ordinal
NÚMERO DE FOLICULOS DE 4 A 8 MM	Cuantitativa continua	Estructura en cuyo interior se da el crecimiento y maduración del ovulo. Contiene liquido folicular.	4 a 8 mm	milímetros	Ecógrafo	Ordinal
CALIDAD DE OVOCITOS	Cualitativa jerárquica	Célula en estado morfológico adecuado para la maduración (40).	A, B, C, D	Membrana plasmática y el cúmulo que rodea a la célula deben estar íntegros.	Estereoscopio	Nominal
CANTIDAD DE OVOCITOS	Cuantitativa continua	La cantidad de ovocitos es establecida por el número de células recolectadas en una sesión	Numérica	Numérica	Estereoscopio	Ordinal
TOTAL DE OVOCITOS RECUPERADOS	Cuantitativa continua	La tasa de recuperación equivale al total de folículos presentes en el ovario sobre el número de ovocitos recuperados por sesión multiplicado por 100.	Numérica	Numérica	Calculadora	Ordinal

c) Ficha de Recolección de Datos

DATOS SINCRONIZACIONES → N° 1

SINCRONIZACIÓN 14 / 01 / 2020

1. SHEYLA → Dispositivo mg.
2. ZENAYDA →
3. IRIS →
4. MONA →
5. PULS →
6. →
7. →
8. →

COLECCIÓN 18 / 01 / 2020

1. SHEYLA (No se colectó) • Ag. 18 •

	2-4mm	4-8mm	6-8mm	8+mm	OBS.	
OD						
OI						
TOTAL						
CALIDAD OVOCITOS	A		B		C	D

2. ZENAYDA • Ag. 18 •

	2-4mm	4-8mm	6-8mm	8+mm	OBS.		
OD							
OI							
TOTAL							
CALIDAD OVOCITOS	A	2	B	4	C	1	D

3. IRIS • Ag. 18 •

	2-4mm	4-8mm	6-8mm	8+mm	OBS.		
OD							
OI							
TOTAL							
CALIDAD OVOCITOS	A		B	2	C	1	D

4. MONA • Ag. 18 •

	2-4mm	4-8mm	6-8mm	8+mm	OBS.		
OD							
OI							
TOTAL							
CALIDAD OVOCITOS	A		B		C	3	D

DATOS SINCRONIZACIONES → N° 2

SINCRONIZACION 28 / 01 / 20

1. SHEVIA → Litoprost[®] 250 (2.2) + E.C.P. (15.2) + Inyectable
2. ZENAOA → "
3. IRIS → "
4. MONA → "
5. POLA → "
6. →
7. →
8. →

COLECCIÓN 01 / 02 / 2020

1. SHEVIA • Ag. 18 • 7 ul lido

	2-4mm	4-8mm	6-8mm	8atmm	OBS.	
OD	5	3				
OI	2				1 fol. dominante	
TOTAL	7	3				
CALIDAD OOCITOS	A	1	B	1	C	D

2. ZENAOA • Ag. 18 • 7 ul lido

	2-4mm	4-8mm	6-8mm	8atmm	OBS.	
OD		5			1 fol. dominante	
OI	4				1 fol. dominante.	
TOTAL	4	5				
CALIDAD OOCITOS	A	1	B	3	C	D

3. IRIS • Ag. 18. • 7 ul lido

	2-4mm	4-8mm	6-8mm	8atmm	OBS.			
OD	2				2 fol. dominante			
OI		6						
TOTAL	2	6						
CALIDAD OOCITOS	A		B		C	1	D	1

4. MONA • Ag. 18 • 6 ul lido

	2-4mm	4-8mm	6-8mm	8atmm	OBS.	
OD	3	3				
OI	3	2				
TOTAL						
CALIDAD OOCITOS	A		B	5	C	D

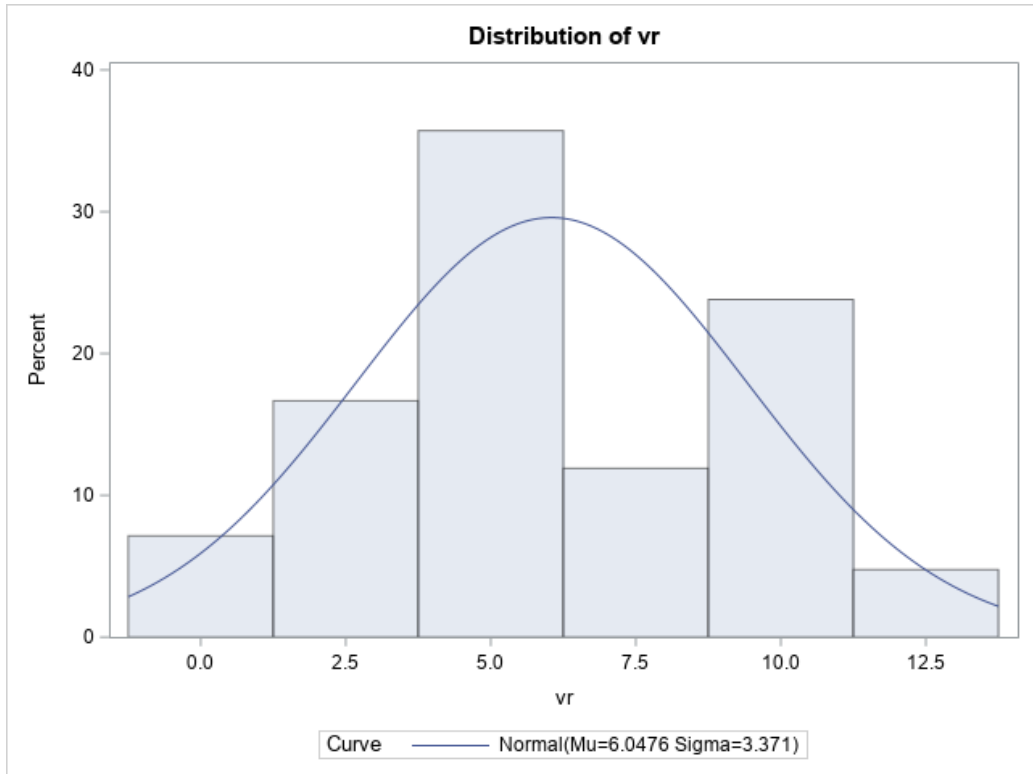
d) Base de Datos

Tto	Blk/Vaca	Rep	Fol 2-4	Fol 4-8	Fol 8 A +	Total Folículos	COCs Viables	COCs No Viables	Total Ovocitos Recuperados
------------	-----------------	------------	----------------	----------------	------------------	----------------------------	-------------------------	----------------------------	---

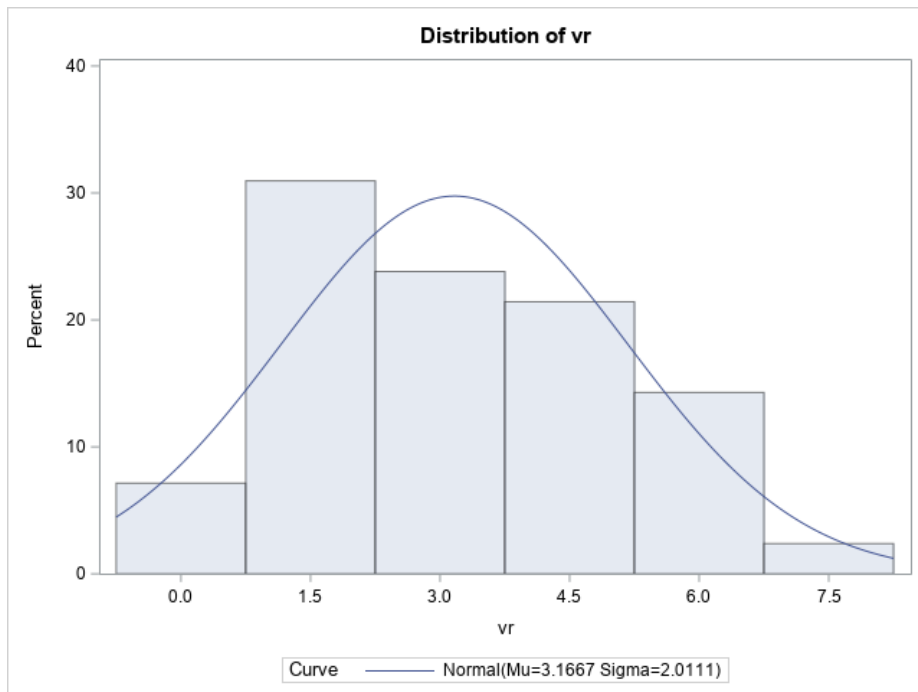
1	1	1	7	3	0	10	3	2	5
1	1	2	5	6	2	13	5	1	6
1	1	3	8	4	0	12	4	1	5
1	2	1	4	5	2	11	4	1	5
1	2	2	8	5	0	13	6	1	7
1	2	3	12	3	0	15	6	2	8
1	3	1	2	6	2	10	2	2	4
1	3	2	10	2	1	13	6	1	7
1	3	3	2	8	1	11	3	0	3
1	4	1	6	5	0	11	5	0	5
1	4	2	11	3	1	15	8	1	9
1	4	3	6	4	0	10	1	4	5
1	5	1	4	6	0	10	3	0	3
1	5	2	2	1	0	3	1	0	1
1	5	3	4	2	0	6	2	1	3
1	6	1	6	0	1	7	3	1	4
1	6	2	2	1	1	4	1	0	1
1	6	3	5	5	0	10	3	1	4
1	7	1	8	1	1	10	3	2	5
1	7	2	3	1	1	4	1	1	2
1	7	3	4	3	1	8	3	1	4
2	1	1	10	3	0	13	3	1	4
2	1	2	3	6	1	10	2	2	4
2	1	3	3	4	0	7	2	2	4
2	2	1	11	4	0	15	4	4	8
2	2	2	6	3	1	10	3	1	4
2	2	3	9	5	0	14	4	4	8
2	3	1	9	3	1	13	2	3	5
2	3	2	4	1	1	6	2	2	4
2	3	3	5	0	0	5	2	1	3
2	4	1	8	1	0	9	5	2	7
2	4	2	5	2	0	7	2	2	4
2	4	3	13	1	0	14	4	3	7
2	5	1	10	3	0	13	4	2	6
2	5	2	0	6	1	7	2	1	3
2	5	3	9	2	0	11	4	2	6
2	6	1	10	1	0	11	2	2	4
2	6	2	5	0	2	7	1	1	2
2	6	3	5	2	0	7	2	1	3
2	7	1	9	3	1	13	2	1	3
2	7	2	0	3	0	3	0	1	1
2	7	3	1	6	0	2	2	1	3

e) Pruebas de Normalidad para las Variables Medidas

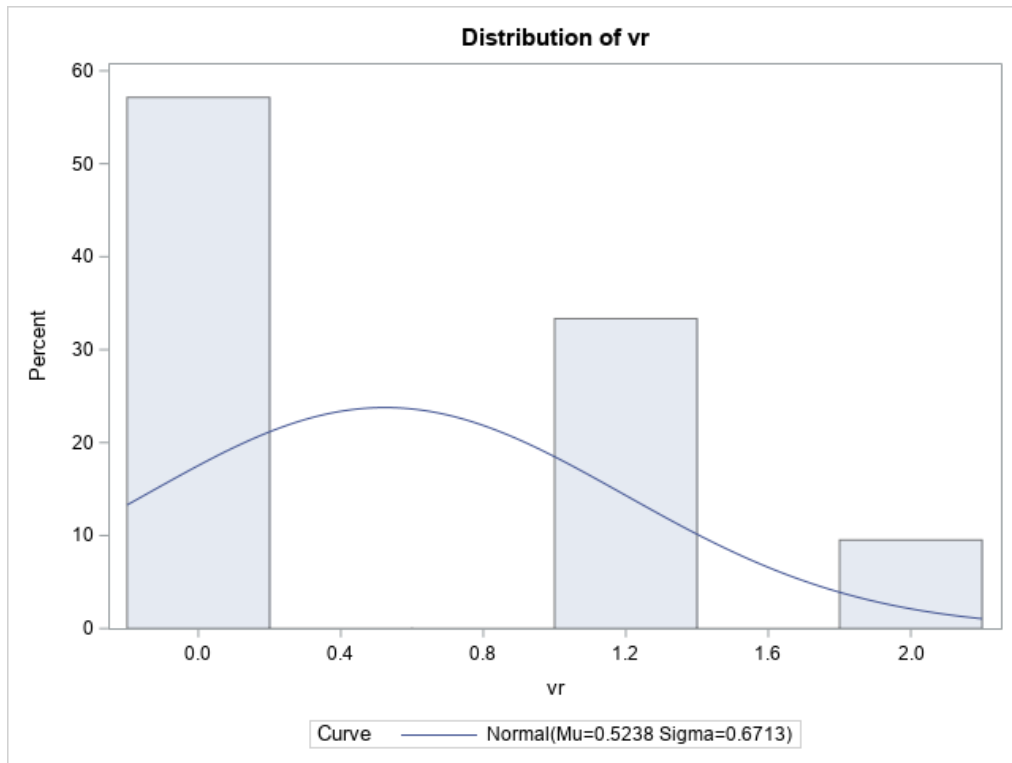
Prueba de normalidad para la variable folículos de 2 a 4 mm de diámetro.



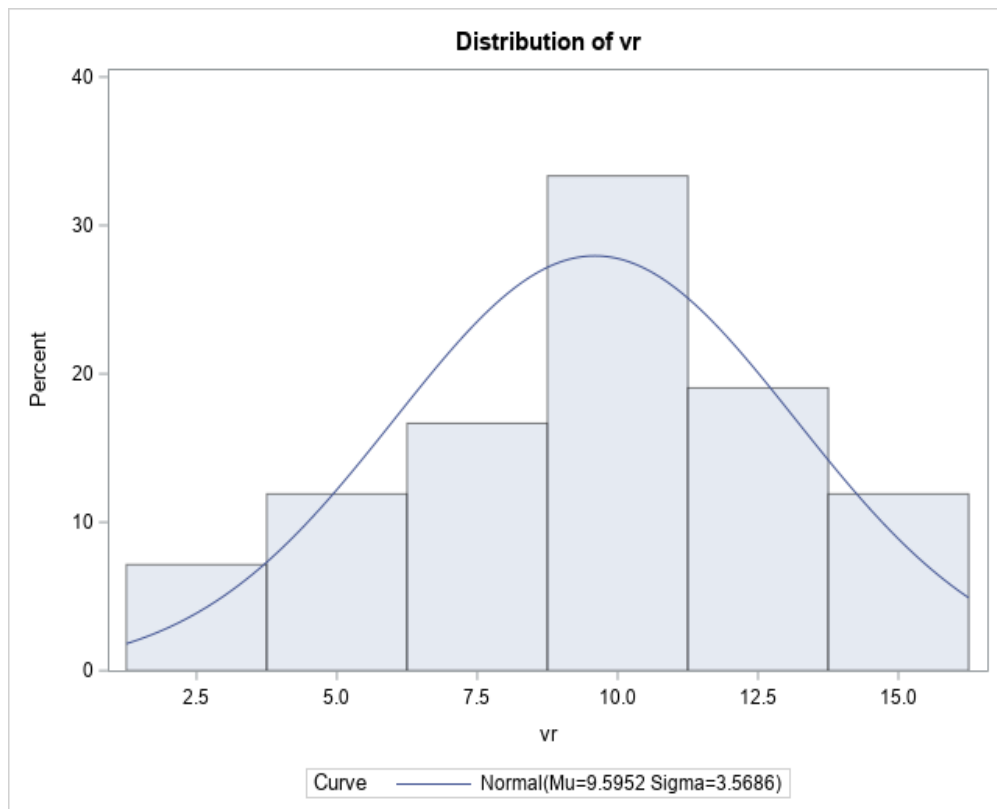
Prueba de normalidad para la variable folículos de 4 a 8 mm de diámetro



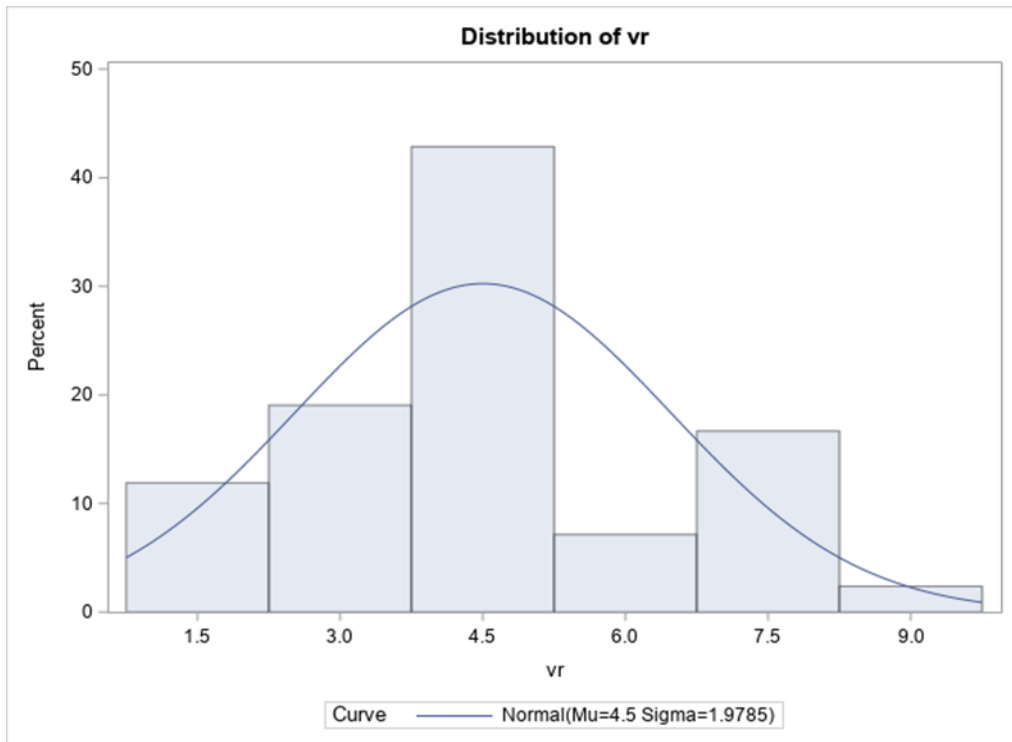
Prueba de normalidad para la variable folículos >8mm de diámetro



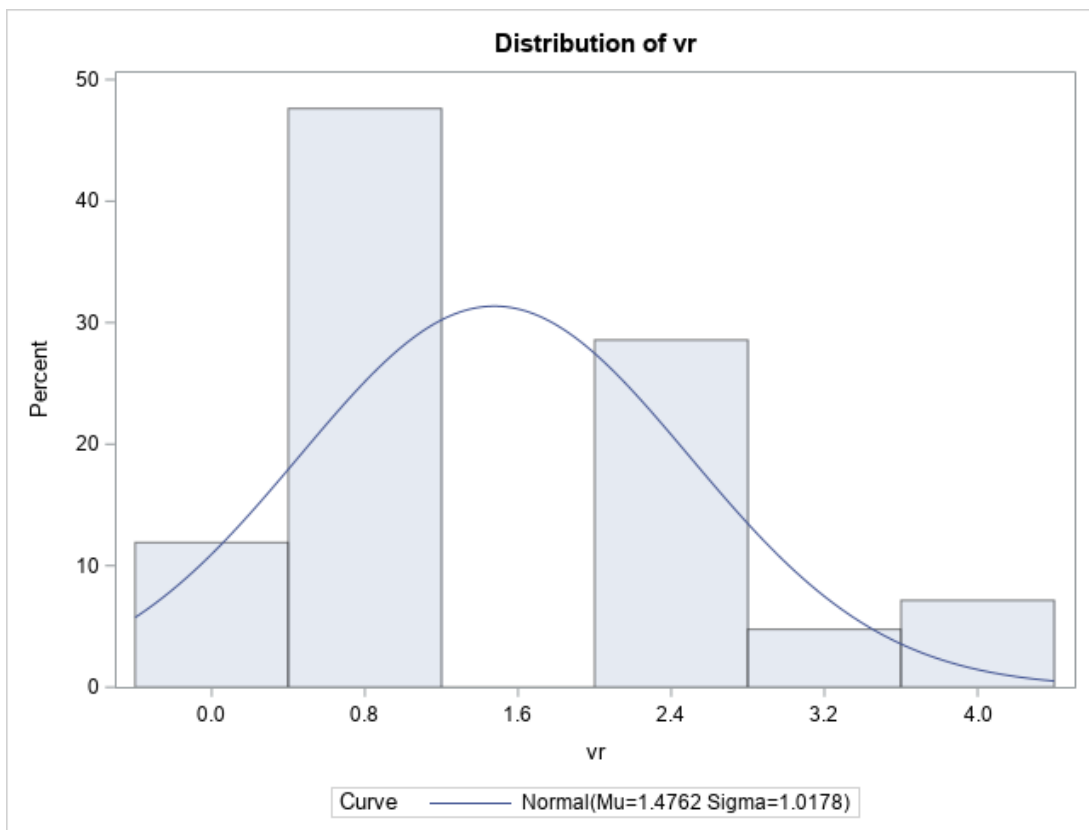
Prueba de normalidad para la variable número total de folículos.



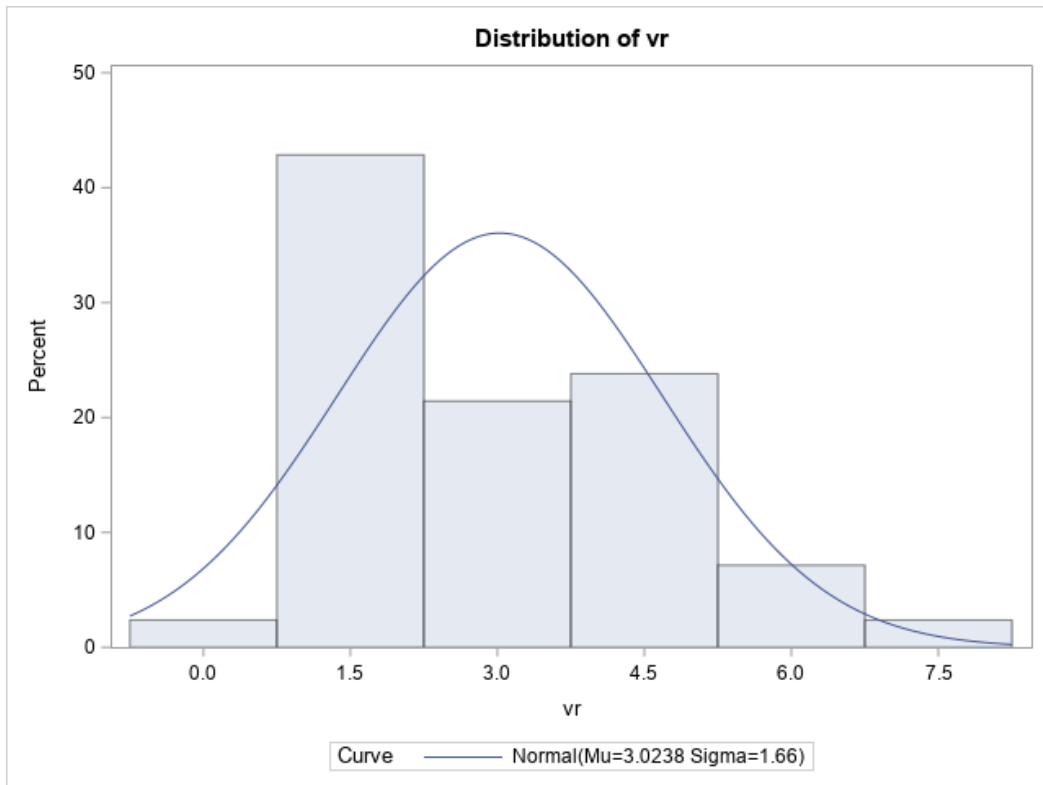
Prueba de normalidad para la variable número total de ovocitos recuperados



Prueba de normalidad para la variable ovocitos no viables

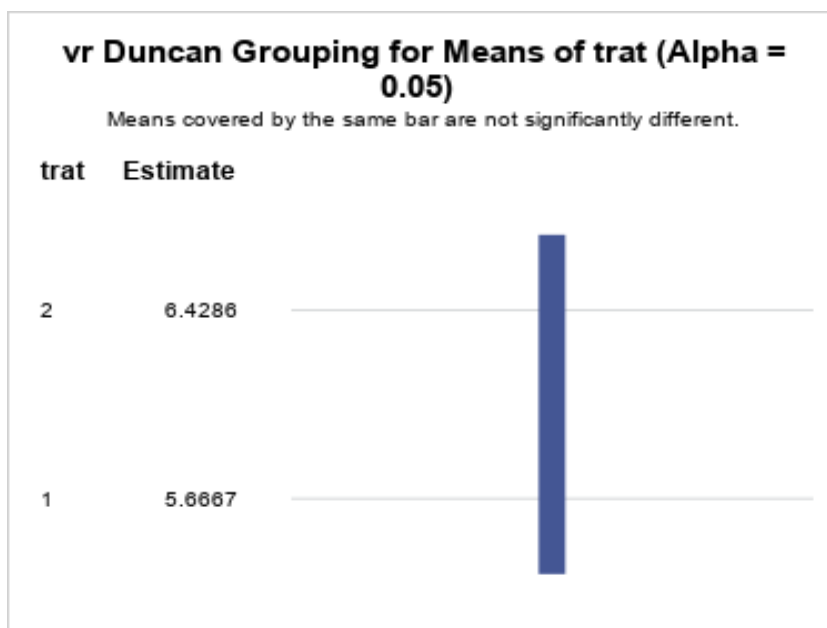


Prueba de normalidad para la variable ovocitos viables

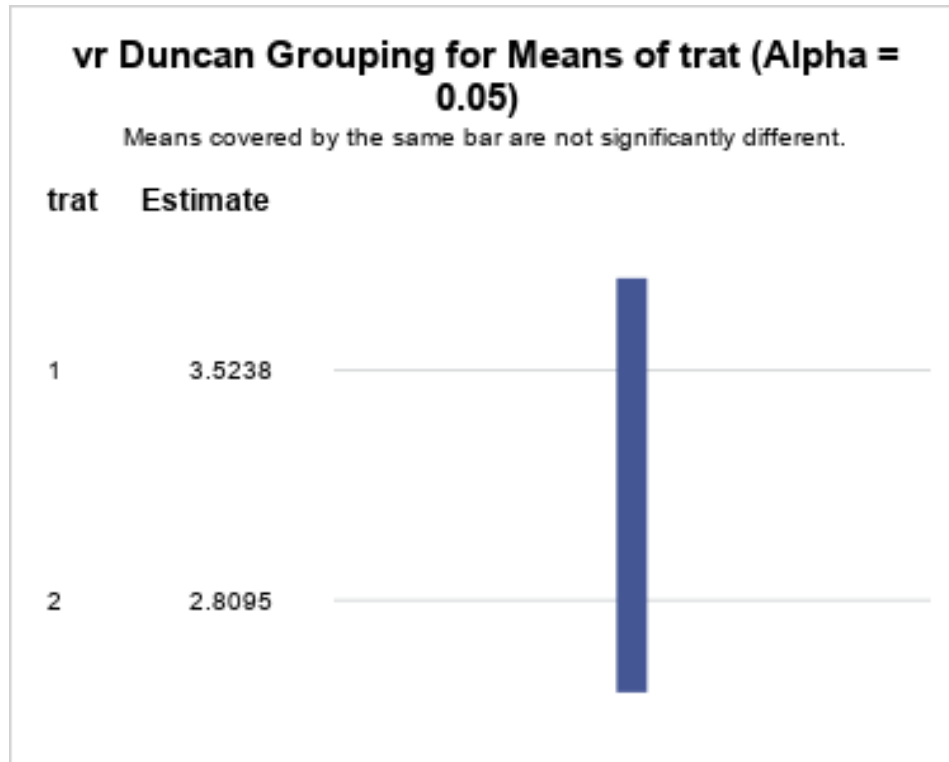


f) Prueba de Comparación de Medias de Duncan de las Variables Evaluadas

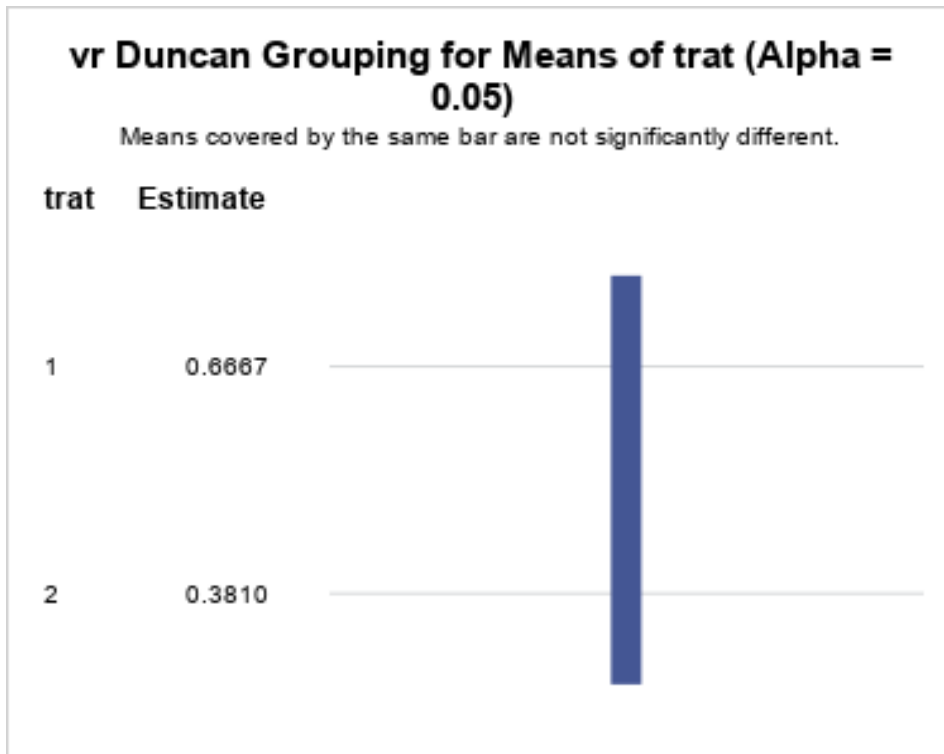
Prueba de comparación de medias para la variable folículos de 2 a 4 mm de diámetro



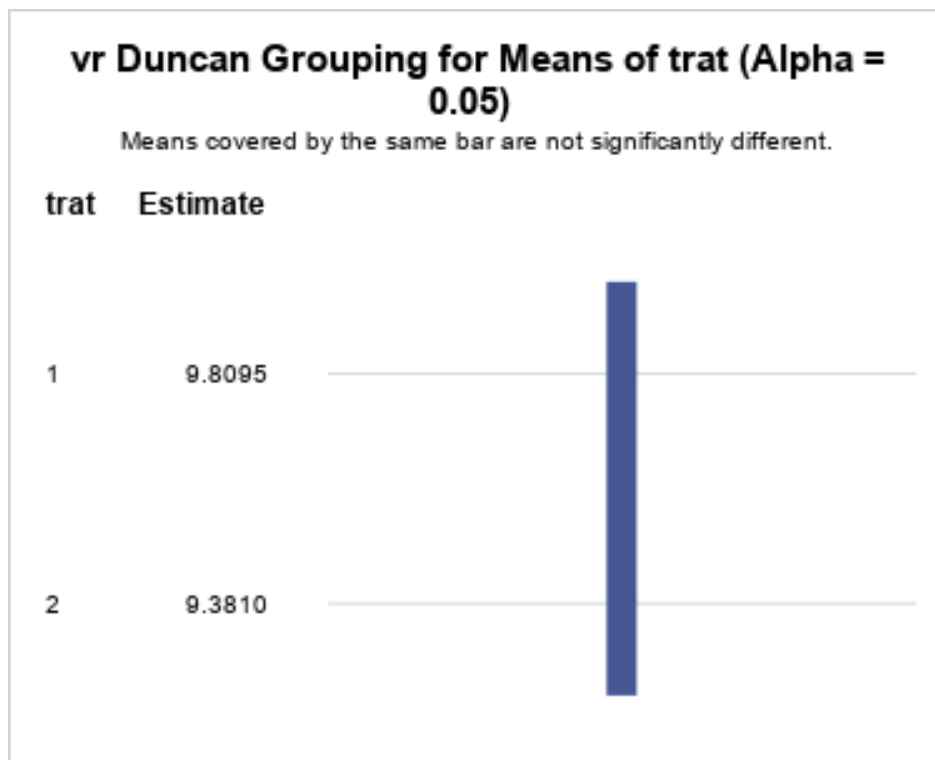
Prueba de comparación de medias para la variable folículos de 4 a 8 mm de diámetro



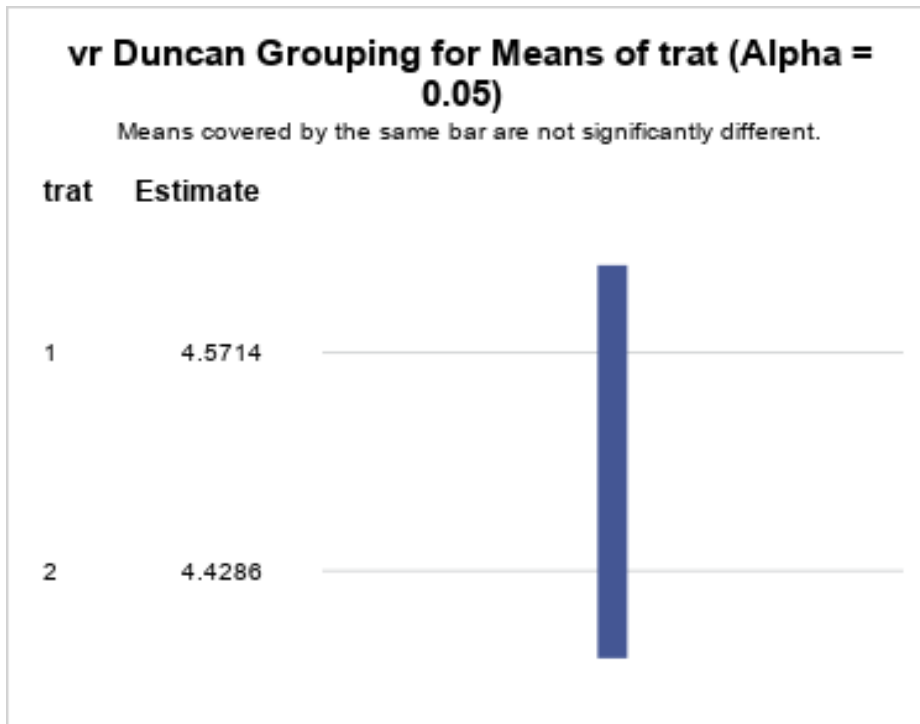
Prueba de comparación de medias para la variable folículos >8 mm de diámetro



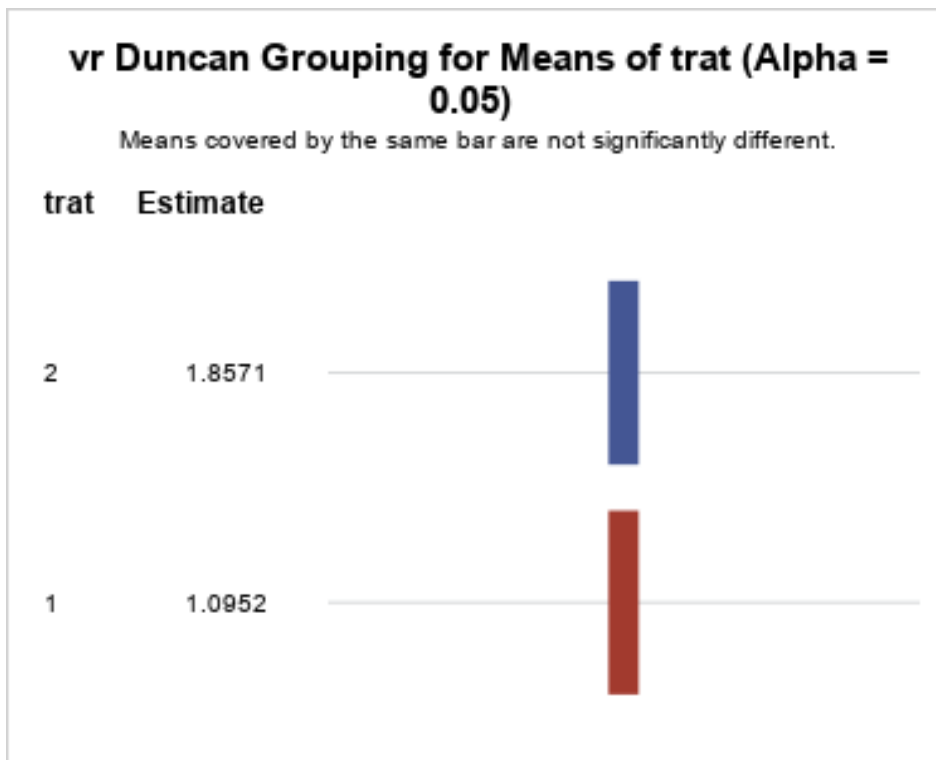
Prueba de comparación de medias para la variable número total de folículos



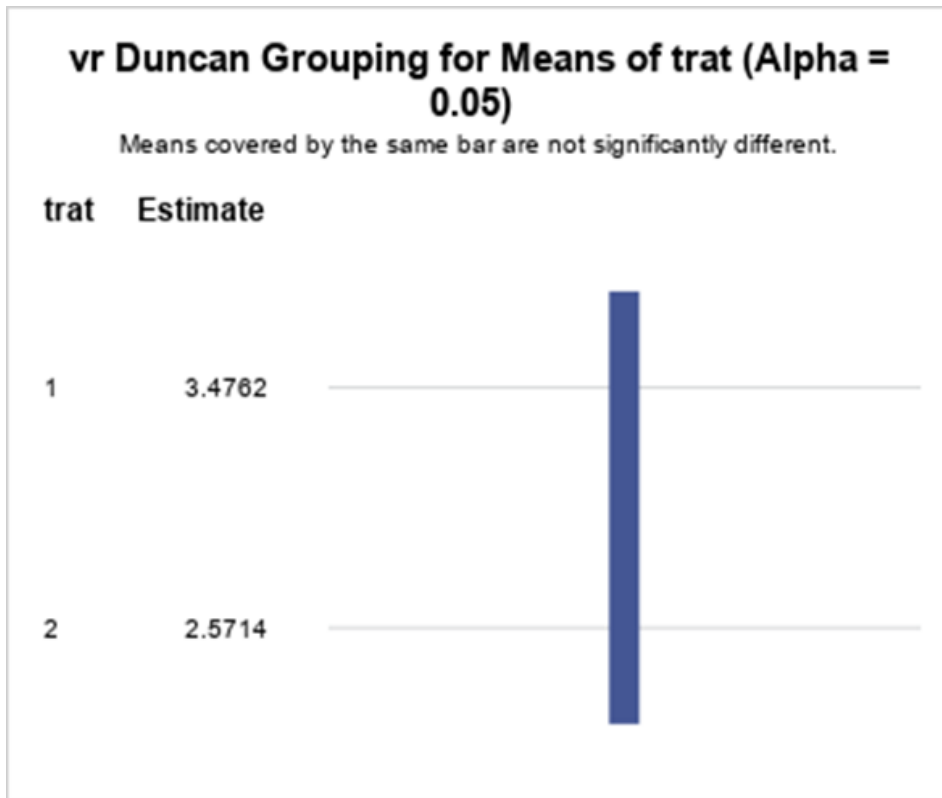
Prueba de comparación de medias para la variable numero total de ovocitos recuperados.



Prueba de comparación de medias para la variable ovocitos no viables



Prueba de comparación de medias para la variable ovocitos viables



g) Evidencias Fotográficas

Foto 1 y 2: aplicación del protocolo de sincronización en las vacas del estudio.





Foto 3: aplicación de anestésico vía epidural a la vaca que se le realizara la colección.



Foto 4: equipamiento utilizado para la recolección de ovocitos mediante la técnica Ovum Pick Up.



Foto 5 y 6: Posición del operador y los equipos durante la colecta de ovocitos mediante la técnica de Ovum Pick Up



Foto 7: Guía de aspiración y tubo de colecta de ovocitos mediante la técnica de Ovum Pick Up.



Foto 8, 9 y 10: imágenes tomadas durante los procedimientos de sincronización y colección de ovocitos.





DECLARACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD

Yo, Andrea Rosario Peña Veliz, identificada con DNI N° 72546305 egresada de la escuela profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, vengo implementando el proyecto de tesis titulado “EFECTO DE DOS TIPOS DE ESTRÓGENO SOBRE LA ONDA FOLICULAR PARA RECOLECCIÓN DE OVOCITOS IN VIVO EN VACAS BROWN SWISS”, en ese contexto declaro bajo juramento que los datos que se generen como producto de la investigación, así como la filiación del establo serán preservados y serán usados únicamente con fines de investigación basado en los artículos 6 y 7 del reglamento del comité de ética de Investigación y en los artículos 4 y 5 del Código de Ética para la investigación Científica de la Universidad Peruana Los Andes , salvo con autorización expresa y documentada del dueño.

Huancayo, 04 de diciembre del 2019

**DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA DEL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN Y AUTORIZACIÓN PARA SU PUBLICACIÓN**

SEÑORA DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA
UNIVERSIDAD PERUANA LOS ANDES

Yo, **ANDREA ROSARIO PEÑA VELIZ**, identificada con DNI N° 72546305,
egresada de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad
de Ciencias de la Salud de la Universidad Peruana Los Andes.

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autora del trabajo titulado: “EFECTO DE DOS TIPOS DE ESTROGENO
SOBRE LA ONDA FOLICULAR PARA RECOLECCIÓN DE OVOCITOS *IN
VIVO* EN VACAS BROWN SWISS”. El mismo que presento bajo la modalidad
de TESIS para optar el Título Profesional.
2. Declaro que mi trabajo cumple con todas las normas de la Universidad Peruana
Los Andes.
3. Acepto las condiciones establecidas por la presente para la publicación.

Huancayo, 01 de mayo del 2023