

UNIVERSIDAD PERUANA LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**



TESIS

**“MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS A DIFERENTES
TIEMPOS Y COLECTADOS DE FOLÍCULOS DE DIFERENTE TAMAÑO
EN CONDICIONES DE SIERRA – 2021”**

Para Optar : Título Profesional de Médico Veterinario y
Zootecnista

Asesor :DR. OCTAVIO ESTEBAN CARHUAMACA
RODRIGUEZ

Autor : Bach. Yosilin Lisbeth Contreras Jeronimo

Línea de Investigación Institucional: Salud y Gestión en Salud

Fecha de Inicio y Culminación: Abril 2021 – Agosto 2021

Huancayo – Perú

2023

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía en la vida.

A mi querida madre y hermanas
que me alientan cada día, a seguir
adelante en cada obstáculo,
brindándome la sabiduría
necesaria en seguir aprendiendo,
caminando, que todo en esta tierra
es posible.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Peruana los Andes por ser mi alma mater,

brindándome docentes de calidad académica.

Quiero agradecer a los maravillosos doctores, magister, que me

brindaron sus grandes conocimientos, enseñanzas y experiencia,

para mi formación como Médico Veterinario.

Al mis queridos y estimados doctores, Dr. Carlos Quispe y la Dra. Edith Ancco,

por sus grandes aportaciones, enseñanzas que enriquecieron mis conocimientos

además, en por la ayuda en la investigación de mi tesis,

siempre estaré muy agradecidos con ustedes.

Al Dr. Octavio, mi asesor de tesis por la paciencia brindada,

correcciones grandes aportes que enriquecieron mi investigación.

A todos ellos muchas gracias por la confianza y el tiempo.

La autora

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:

MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS A DIFERENTES TIEMPOS Y COLECTADOS DE FOLÍCULOS DE DIFERENTE TAMAÑO EN CONDICIONES DE SIERRA - 2021

Cuyo autor (es) : **CONTRERAS JERONIMO YOSILIN LISBETH**
Facultad : **CIENCIAS DE LA SALUD**
Escuela Profesional : **MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**
Asesor (a) : **DR. CARHUAMACA RODRIGUEZ OCTAVIO ESTEBAN**

Que fue presentado con fecha: 20/03/2023 y después de realizado el análisis correspondiente en el software de prevención de plagio Turnitin con fecha 20/03/2023; 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 22%.

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 una sola vez.

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

Huancayo, 23 de marzo de 2023

UNIVERSIDAD PERUANA LOS ANDES
Facultad de Ciencias de la Salud



P.D. EDITH ANCCO GOMEZ
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

CONSTANCIA N° 121 - DUI - FCS - UPLA/2023

c.c.: Archivo
EAG/vjdp

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | IV |
| I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 7 |
| 1.1. Descripción de la realidad problemática | 9 |
| 1.2. Delimitación del problema | 9 |
| 1.3. Formulación del problema..... | 9 |
| 1.3.1. Problema general | 9 |
| 1.3.2. Problemas específicos | 9 |
| 1.4. Justificación..... | 9 |
| 1.4.1. Social | 9 |
| 1.4.2. Teórica | 10 |
| 1.4.3. Metodológica | 11 |
| 1.5. Objetivos..... | 11 |
| 1.5.1. Objetivo general | 11 |
| 1.5.2. Objetivos específicos | 12 |
| II. MARCO TEÓRICO | 13 |
| 2.1. Antecedentes | 13 |
| 2.2. Bases teóricas o científicas..... | 19 |
| 2.3. Marco conceptual | 24 |
| III. HIPÓTESIS | 26 |
| 3.1. Hipótesis General..... | 26 |
| 3.2. Hipótesis específicas..... | 26 |
| 3.3. Variables | 27 |
| 3.4. Operacionalización de las variables..... | 28 |
| IV. METODOLOGÍA | 30 |
| 4.1. Método de investigación | 30 |
| 4.2. Tipo de investigación | 30 |
| 4.3. Nivel de investigación | 30 |
| 4.4. Diseño de la investigación..... | 30 |
| 4.5. Población y muestra | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 4.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos | 32 |
| 4.7. Técnicas de procesamiento y análisis de datos..... | 32 |
| 4.8. Aspectos éticos de la Investigación | 34 |
| | |
| V. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS..... | 35 |
| 5.1 Presentacion de resultado | 35 |
| 5.2. Discusion de resultados | 43 |
| | |
| VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 46 |
| | |
| ANEXOS..... | 49 |
| Anexo 1: Matriz de consistencia | 50 |
| Anexo 2: Matriz de Operalización de Variables | 56 |
| Anexo 3: Ficha de Recoleccion de Datos | 63 |
| Anexo 4: Declaracion de Confidencialidad..... | 64 |
| Anexo 5: Compromiso de Autoria | 65 |
| Anexo 6: Analisis estadistico | 66 |
| Anexo 7: Evidencias Fotograficas..... | 69 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tablas | N° |
|--|-----------|
| Tabla N° 1: Características de la calidad de los ovocitos Blondin y Sirad..... | 24 |
| Tabla N° 2: Efecto de la triple interacción de la técnica, diámetro y horas de maduración sobre la cantidad de ovocitos madurados..... | 37 |
| Tabla N° 3: Efecto del tiempo de maduración sobre la cantidad de ovocitos madurados ... | 39 |
| Tabla N° 4: Efecto del diámetro folicular sobre la cantidad de ovocitos madurados..... | 41 |
| Tabla N° 5: Efecto de la técnica de Aspiración y Slicing sobre la cantidad de ovocitos madurados..... | 42 |

INDICE DE FIGURAS

| Figuras | N° |
|---|-----------|
| Figura N°1: Clasificación de la calidad de los Ovocitos..... | 25 |
| Figura N° 2: Efecto de la triple interacción de la técnica, diámetro y horas de maduración sobre la cantidad de ovocitos madurados..... | 38 |
| Figura N° 3: Efecto del tiempo de maduración sobre la cantidad de ovocitos madurados ... | 40 |
| Figura N° 4: Efecto del diámetro folicular sobre la cantidad de ovocitos madurados..... | 41 |
| Figura N°5: Efecto de la técnica de Aspiración y Slicing sobre la cantidad de ovocitos madurados..... | 42 |

RESUMEN

La maduración *in vitro* es un punto de suma importancia en la biotecnología reproductiva, ya que es parte de la producción *in vitro*, que está compuesto por tres etapas, maduración *in vitro*, fertilización *in vitro* y capacitación *in vitro*, lo que se considera que la maduración es la etapa más crítica, puesto que el ovocito sufre grandes cambios morfológicos y funcionales. El objetivo de la presente investigación fue determinar la tasa de maduración *in vitro* a tiempos de 18,20,22,24 horas, de diámetro folicular de 2-4 mm y 5-8mm con las técnicas de slicing y aspiración en condiciones de Sierra. Se utilizó el método científico, de tipo aplicado, nivel explicativo, diseño cuasi experimental. El análisis de los datos fue a través de estadística descriptiva y estadística inferencial a través de análisis de varianza con un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Los resultados ($p < 0.000$) con variables de cantidad de ovocitos, calidades de ovocitos, ovocitos viables e inviables según a la técnica y diámetros. En conclusión, que la capacidad de maduración *in vitro* bovino a diferentes tiempos tienen mejores resultados de 22-24 horas con un promedio de maduración *in vitro* de 18.12 ± 3.5 y $16.2 \pm 6.84b$ ($p=0.001$). El diámetro folicular óptimo de 2-4 mm, con un promedio de maduración de 17.6 ± 9.13 , con un valor de $p=0.04$. La técnica de aspiración óptimo con un promedio de maduración de 19.0 ± 7.55 , con un valor de ($p=0.001$)

Palabras claves: ovocitos, maduración, diámetro, técnica slicing y aspiración.

ABSTRACT

In vitro maturation is a very important point in reproductive biotechnology, since it is part of in vitro production, which is made up of three stages, in vitro maturation, in vitro fertilization and in vitro training, which is considered to be the Maturation is the most critical stage, since the oocyte undergoes great morphological and functional changes. The objective of this research was to determine the in vitro maturation rate at times of 18,20,22,24 hours, with a follicular diameter of 2-4 mm and 5-8 mm with the slicing and aspiration techniques under Sierra conditions. The scientific method was used, of an applied type, explanatory level, quasi-experimental design. The data analysis was through descriptive statistics and inferential statistics through analysis of variance with a completely randomized design with factorial arrangement. The results ($p < 0.000$) with variables of oocyte quantity, oocyte quality, viable and inviable oocytes according to the technique and diameters. In conclusion, that the bovine in vitro maturation capacity at different times have better results of 22-24 hours with an average in vitro maturation of 18.12 ± 3.5 and $16.2 \pm 6.84b$ ($p = 0.001$). The optimal follicular diameter of 2-4 mm, with an average maturation of 17.6 ± 9.13 , with a value of $p = 0.04$. The optimal aspiration technique with a maturation average of 19.0 ± 7.55 , with a value of $p = 0.001$

Key words: oocytes, maturation, diameter, slicing and aspiration technique.

INTRODUCCIÓN

En el siglo XXI aún existen grandes descubrimientos de la vida a beneficio de la sociedad tanto en su aspecto de la alimentación, salud, ganadería, clima. Cuando hablamos de ganadería se está viviendo una revolución por mejorar las técnicas y uso de las tecnologías de reproducción animal, ya que antes era inevitable perder a un animal de alto valor genético, si nos enfocamos a los órganos reproductivos vamos a conocer que se presenta una relación entre la capacidad meiótica con la relación de maduración, tiempo de incubación para su maduración. Además, que una buena maduración de ovocito nos dará paso a tener altos índices de fertilidad como también que el desarrollo potencial de un embrión será a causa de un excelente origen de calidad(1). Ya que los usos de estas técnicas deben garantizar la preservación de la vida, pero para ello lo vamos a realizar con el uso de dos técnicas en ovarios de camal de vacas que son de descarte, pero en su vida productiva fueron altamente lecheras y cárnicas, además que tienen alto valor genético se terminó la vida productiva, dejando pocos descendientes en el hato. Por ello el uso de recuperación folicular son de slicing que consiste en realizar cortes de manera longitudinal y transversal para poder obtener los ovocitos y colocarlos en la placa Petri para su posterior evaluación así mismos la comparación con la técnica de aspiración que es el ingreso de una aguja N° 18 x 1 ½ en el ovario y después colocado en la placa Petri para su evaluación. Pocos estudios se realizaron a condición Sierra ya que debemos saber que la presión atmosférica también va jugar un rol de beneficio o en contra. Por ello nos planteamos el siguiente objetivo que es evaluar la capacidad de maduración in vitro en 18 horas, 20 horas, 22 horas y 24 horas de ovocitos bovinos recuperados de folículos de dos tamaños diferentes y de dos formas de recuperación slicing y aspiración. Los tamaños de los folículos son de 2 a 4 mm y de 4 a 8 mm de diámetro, mientras que

la fuente de recuperación se dará con dos técnicas que es slicing y aspiración de ovarios de camal en condiciones de Sierra. Como menciona los diversos autores, hay gran apreciación con la técnica de aspiración en ovarios de camal. Aparte también tener la consideración de higiene en el manejo de estas técnicas. El informe final de tesis se subdivide en 6 secciones que se detallan a continuación. El presente informe tiene los siguientes capítulos:

Sección I: Hace referencia al planteamiento del problema, la formulación, justificación y objetivos.

Sección II: Considera el marco teórico, los antecedentes de la investigación, las bases teóricas y el marco conceptual

Sección III: Se describen las hipótesis y la Operacionalización de variables.

Sección IV: Presenta la metodología

Sección V: Presentación y discusión de resultados

Sección VI: Especifica las referencias bibliográficas.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del Problema

Las Biotecnologías reproductivas son técnicas para el desarrollo, progreso genético y poder obtener la herencia de un animal que es muy valioso por su alta capacidad de producción de lana, carne o leche, así como los derivados que pueden surgir de ellos, pero estas tecnologías se dieron en el siglo XX, donde la Comisión Europea en los años 30-40 duplicaron su producción láctea gracias al avance genético que ellos tuvieron. Las biotecnologías son desde uso de la inseminación artificial, transferencia de embriones, producción in vitro (2) según la Revista Embryo Transfer Society en los años 2011 la maduración, fertilización in vitro llegó al alcance de 40000 transferencia a nivel mundial. así mismo que cada bovino nace con alrededor de 400000 a 100000 ovocitos, lo cual 0.1% llegan a ovular, y el resto no se aprovecha adecuadamente (3).

La ganadería en costa y selva por contar con un sistema intensivo y semi intensivo de producción invierten para generar mayor índice de producción donde usan ampliamente la inseminación artificial y están ingresando con el uso de biotecnologías en casos de vacas problemas para concebir, caso contrario sucede en la Sierra que escasamente utilizan inseminación artificial.

Pero utilizar solo inseminación artificial como progreso genético es tiene un avance significativo pero no el único, las biotecnologías reproductivas no solo se basa en inseminar, también el poder utilizar los recursos que se están destinado a descarte porque ya se le termino su vida productiva, esto puede cambiar si comenzamos generar conocimiento sobre el uso de técnicas biotecnológicas para su aprovechamiento de estos recursos, así mismo iniciar un proceso de maduración in vitro, fecundación in vitro y

criopreservación de material genético, producción in vitro, transferencia nuclear, programas de súper ovulación entre otras. Según la fisiología del animal solo se utiliza el 0.01% de óvulos en toda su vida reproductiva, podemos cambiar este panorama con uso de la técnica de slicing y aspiración que no son las únicas, pero son las más accesibles para estudiantes y personas que deseen contribuir con la ciencia animal. Puesto hay muchos puntos que aún se desconocen y necesitan ser investigados como el tiempo para obtener altos índices de maduración in vitro, fertilización in vitro, conocer el diámetro folicular apropiado en nuestra región porque algunos autores mencionan que el rango es de 1 a 9 mm, pero ese punto fue estudiado en zonas cálidas, debemos tener datos de nuestra región que al encontrarse a 3200 m.s.n.m por la variación de la presión atmosférica. Según la FAO los problemas que se enfrentan los recursos genéticos a nivel mundial, uno de ellos son los climas cálidos y húmedos y otros ambientes hostiles comunes a los países en desarrollo (4)

Lo que debemos hacer es iniciar y aportar a la ciencia los datos correctos para comenzar a tener altos índices de preñez gracias a las biotecnologías reproductivas, conocer el tiempo adecuado para la maduración y su influencia con la presión atmosférica para su maduración y posteriormente en investigaciones futuras fertilización in vitro, conocer la relación entre tiempos de maduración, diámetro folicular para la maduración y técnica con mayor calidad y menor daño en la obtención de ovocitos de camal.

1.2 Delimitación del problema

Delimitación espacial:

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal del Programa de Ganadería de la Estación Experimental “El Mantaro”, perteneciente a la Universidad Nacional del Centro del Perú, ubicado a 3320 m.s.n.m. con temperatura promedio de 15C °.

Delimitación temporal:

El estudio se realizó en los meses de abril hasta agosto del 2021.

Delimitación del universo:

El trabajo consistió en la colecta de los ovarios de camal “AURAY”, ubicado en el distrito de Chilca, Provincia de Huancayo, que fueron recolectados de manera diaria entre los meses de abril hasta agosto del 2021.

1.3 Formulación del Problema de Investigación

¿Cuál será la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovino a diferentes tiempos y colectados de folículos de diferente tamaño en condiciones de Sierra-2021?

1.3.1 Problemas Específicos

- ¿Cuál será la capacidad de maduración in vitro de ovocito bovino a diferentes tiempos en condiciones de Sierra-2021?
- ¿Cuál será la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos colectados de folículos de 2 a 4 mm y 5 a 8 mm de diámetro en condiciones de Sierra- 2021?
- ¿Cuál será la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos recolectados mediante dos técnicas?

1.4. Justificación

1.4.1 Justificación Social

El proyecto nos permitió conocer sobre la técnica de biotecnología reproductiva, por lo cual se pudo conocer los tiempos propicios para la maduración del ovocito lo cual conlleva a la fertilización y así tener altos índices de preñez. Esto nos permitirá utilizar los ovarios que son desechados en el camal, lo que nosotros para fines académicos lo vamos a utilizar. También que la colecta de los ovocitos postmortem, siendo viable. Esto se puede utilizar en los animales de alto valor genético destinados a camal por lo cual se puede preservar el valor genético. Así mismo vamos a conocer los tiempos propicios para maduración, como el tamaño de los folículos y el uso de las dos técnicas de slicing y aspiración en condición de Sierra, ya que la mayoría de los estudios se realizó en zonas de Costa y Selva.

1.4.2 Justificación Teórica

En pleno avance de la ciencia en múltiples ámbitos se tuvo grandes desconocimientos en biotecnologías reproductivas, por lo cual fue necesario conocer el tiempo adecuado de maduración in vitro, ya que la calidad de la concepción es tener un excelente ovocito, eso nos conlleva a altas tasas de fertilización in vitro para un investigación futura, puesto son temas que necesitan seguir investigándose por los pocos datos que se conocen, puesto se diversas investigaciones realizadas aún tienen bajas tasas de fecundación, así mismo en conocer el diámetro óptimo en la recolecta de los ovocitos, ya que no todos los diámetros fueron óptimos para la maduración in vitro. En otro aspecto, en la aplicación de la técnica de slicing y aspiración, para la

aspiración de los ovocitos, se utilizó, primero para obtener los ovocitos, segundo esta técnica dañan menos las capas de cumulus ofuroos, ya que esta capa protege al ovocito, también que muchos no tienen la experiencia necesaria para poder manejar esta técnica por ello se quiere comparar cuál de ellas son más efectivas en cantidad de ovocitos, con menos daños de diámetro folicular.

A pesar del avance científico de la aplicación de las biotecnologías reproductivas y especialmente de los sistemas de fertilización in vitro, aún existe un cierto vacío de información sobre factores y variables específicas que pudieran estar interviniendo sobre el éxito de estas técnicas.

1.4.3 Justificación Metodológica

Desde el punto de vista metodológico la investigación constituye una plataforma para evidenciar que la aplicación de biotecnologías como la maduración y posteriormente a la fertilización in vitro, la producción in vitro, la criopreservación de especies entre otras, en pocas cantidades se estuvo realizando en nuestro país, puesto se debe conservar el material genético muy valioso para los ganaderos en condiciones de producción de Sierra y que los resultados puedan estar al servicio de ellos, por ello en nuestro trabajo realizamos primero el uso de las técnicas de recolección de ovocitos, después el uso de los folículos de 2-8 mm, disminuyendo la amplitud de los rangos que usaron otros investigadores, después madurando a horas proporcionadas, del cual se obtuvo un ovocito de calidad con una excelente maduración in vitro con las características que le corresponde. Desde un punto de vista científico

la investigación sirvió de guías para posteriores investigaciones como fertilización in vitro, producción de embriones entre otras, también que si bien es cierto es de aplicación amplia en otros escenarios mundiales para la realización de estudio científico en el área de reproducción animal y biotecnologías.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

Determinar la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovino a diferentes tiempos y colectados de folículos de diferente tamaño en condiciones de Sierra-2021

1.5.2 Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos a diferentes tiempos en condiciones de Sierra-2021
- Determinar la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos colectados de folículos de 2 a 4 mm y 5 a 8 mm de diámetro en condiciones de Sierra-2021
- Determinar la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos colectados mediante dos técnicas.

II. MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes de Estudio

2.1.1 A nivel Internacional

Estrella C., Suconota A., (5), presentó un estudio abordando a la Viabilidad y morfología de ovocitos bovinos de ovarios de matadero de acuerdo al diámetro folicular en Ecuador, clasificando a los folículos ovarios en tres tratamientos o tres grupos G1 (<4mm) G2 (4-8mm) y G3 (>8mm) con 14 repeticiones de aspiración de un total de 648 ovarios donde se obtuvieron 5.21% folículo ovárico, aspirando un total de 3373 folículos. Dando en el G1 < 4mm (n:1964folículos ováricos), G2 2-4mm (n: 1073 folículos ováricos) y G3 >8mm (n:336 folículos ováricos). Se realizó la maduración a 38.5 C°, 5% de CO₂ y 90% de humedad en 24 horas, sólo el grupo G1 y G2 llegaron a la metafase II en un 75% a diferencia del G3 (61%), (P< 0.05). Tras su maduración los tres grupos disminuyeron su diámetro y los cumulus ofuroos que provenían del folículo de 4-8mm son los que tienen >% de maduración y culminan su crecimiento.

Saleh W., (6) presentó el estudio sobre Evaluación de diferentes métodos de recolección y maduración de ovocitos bovinos y fertilización in-vitro de ejemplares de matadero en Irak, lo cual su objetivo de estudio fue analizar el mejor método de obtención de ovocitos, tanto en volumen como en cantidad, asimismo que técnica es la más económica, lo cual se recolectaron 45 ovarios de camal de bovinos del matadero de Al-Shoáalla al noroeste de Bagdad, se llevaron en caja al laboratorio para ser lavado y colocado antibióticos para eliminar sus

contaminación. Se realizó en cuatro grupos de aspiración, corte, corte después de la aspiración y corte, donde se obtuvieron datos de 55, 68, 87, 106 ovocitos, donde por el corte se puede encontrar más ovocitos. Del momento del sacrificio hasta la manipulación de la muestra a mayor tiempo de tratamiento y encontrar los ovocitos pues tendremos menor ovocito de calidad, a 2 horas presenta 75%, 6 horas 68%, 12 horas 6% y 24 horas 55%.

Díaz S., (7) Efecto del tiempo de maduración in vitro de los ovocitos bovinos sobre el porcentaje de blastocisto obtenidos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano en Honduras, que determinaron el efecto de tiempo de maduración in vitro, por ello colectaron 23 horas, se utilizó la técnica de aspiración folicular, donde se obtuvieron 63 ovocitos viables con un promedio de 2.83 ovocitos por ovario. En el porcentaje de maduración no presenta diferencias ($P>0.05$) con 73.53% 18 horas, 74.19% 24 horas; la fertilización fue de 76% y 60.87% para 18 y 24 horas.

Hernández *et al*, (8) realizó la siguiente investigación donde compararon dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración in vitro, donde se utilizaron 300 ovarios de camal. Se utilizó la técnica de aspiración de 2-8mm de diámetro con la ayuda de la aguja N°18, para la técnica de “Slicing” se utilizó la hoja de bisturí N°22 para realizar cortes transversales y sagitales. Su clasificación se realizó según las capas de cumulus oophorus que presentaban los ovocitos, estos cuentan con cuatro categorías que son A, B, C y D. La variable clasificatoria fue, técnica de recolección, % madurables, % no madurables, promedio ovocitos madurables/ovarios, promedio ovocitos no madurables/ovario y promedio

ovocitos totales/ovario. El % ovocitos madurables/ovario $73,49 \pm 24,54$; $65,17 \pm 10,52$ y no madurables/ovario $26,5 \pm 24,54$; $34,82 \pm 10,52$ para aspiración y slicing, respectivamente ($P > 0.05$). El promedio de ovocitos/ovario resultó en $4,58 \pm 1,05$ y $7,03 \pm 3,34$ para aspiración y slicing, respectivamente ($P > 0.05$), el promedio de ovocitos madurables/ovario $3,24 \pm 1,11$ y $4,37 \pm 1,45$ para aspiración y slicing, respectivamente ($P > 0.05$) y el promedio de ovocitos no madurables/ovario $1,33 \pm 1,40$ y $2,66 \pm 1,96$ para aspiración y slicing, respectivamente ($P < 0.05$). deduciendo que la técnica slicing se recupera más ovocitos, pero la calidad de los ovocitos con mejores con la técnica de aspiración.

2.1.2 A nivel Nacional

Delgado R. (9), realizó un estudio sobre la maduración in vitro de ovocitos en metafase II de vacas post mortem a través de la técnica de fijación, lo cual lo realizó obtuvo los ovarios del camal de Yerbateros donde se aspiraron 1653 folículos de 166 ovarios con un promedio de 10.26 folículos, estos folículos fueron recuperados 1228. De los 1228 se obtuvo la clasificación de la categoría de A 196 ovocitos, categoría B 168 ovocitos, categoría C 513 ovocitos, categoría D 351 ovocitos con un porcentaje de A 1.44%, B 1.04%, C 2.99% y D 2.10; de los cuales solo los aptos para la maduración fueron 2.19%. estos datos se obtuvieron con la técnica de aspiración que fue menor a otros autores. Posteriormente se realizó la maduración a 24 horas con una atmósfera de 5% CO₂ y a temperatura de 38.5 C°, obteniendo un 57.78% de ovocitos maduros sin uso de hormonas, llego a la etapa de metafase solamente un 57.78%.

Segura G. (10) presentó el estudio sobre evaluación in vitro de la capacidad de maduración y desarrollo embrionario de ovocitos bovinos extraídos de folículos de tres diámetros diferentes, para ello se obtuvieron ovarios de camal para posteriormente ser extraído, los diámetros que se evaluaron fueron de 1-2mm; 3-4 mm y 5-6mm. Los primeros 30 ovocitos se determinó el diámetro, el otro grupo la maduración a 24 horas con una atmósfera húmeda de 5% CO₂ y 38.5 C°. Los rangos de 1-2mm y 3-4 mm presentan un mayor porcentaje de maduración, pero para la producción de embriones de diámetro con mejores resultados fueron de 5-6 mm, dándose como conclusión que de 1-4 mm tienen mejor competencia meiótica, pero también se llegó a la conclusión de que no existe relación entre diámetro folicular y diámetro de ovocito, puesto se obtuvieron datos que el diámetro folicular de 1-2mm presentó un diámetro de ovocito de 115.1um; 3-4mm presentó 113.04 um y 5-6mm de 113.84 um. Así mismo preciso que existe una diferencia significativa con ($p > 0.05$) ante el desarrollo de embriones de los ovocitos con rangos foliculares donde el > rango en desarrollo de blastocisto presentó 3-4 mm (31%), 5-6 (39%) y 1-2mm (25%), los cumulo oophorus fueron madurados a 24 horas, fecundos a 18 horas y cultivados in vitro 7 días.

Según Gómez *et al.*, (11) técnicas del slicing y aspiración folicular en la eficiencia de la recuperación de ovocitos bovinos criollos postmorten en el camal, lo cual esta investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad de Apurímac lo cual se tomó 200 ovarios de vacas criollas que fueron sacrificadas en el camal de Abancay, donde los ovarios se trasladaron con suero fisiológico al 0.9% con temperatura de 30-35 C°, para la técnica de slicing se utilizó 100 ovarios, se realizó cortes transversales y longitudinales donde se

encontró folículos de 2-8 mm, así mismo para la técnica de aspiración se utilizó la cantidad de 100 ovarios, se introdujo una jeringa con aguja N° 18 de 10 ml para poder realizar la aspiración de la misma. Se calificó por categorías y solo las categorías A y B son las viables para su procesamiento de maduración; los datos obtenidos de comparación de técnicas de recuperación de slicing y aspiración tiene similar categorización de ($P > 0.05$) dando a la técnica slicing los resultados de grado A 151 (28.42%), B 95 (17.89%), C 146 (27.37%) y D 140 (26.32%), para aspiración folicular son A 118 (27.70%), B 90 (21.13%), C 118 (27.70) y D 100 (23.47%). También no se encontró la relación de la calidad del folículo ($P > 0.05$) respecto al uso de técnica de slicing y aspiración de folículos de 2-8 mm sin importar el ciclo estral de la vaca. Se obtuvieron datos con el uso de slicing para MIV Y FIV es de 246 (46.24%), técnica de aspiración 208 (48.83%). Encontrados malos en aspiración fueron de 218 (21.17%) y slicing fueron de 286 (53.76). Las técnicas de slicing y aspiración folicular proveen 5.32 y 4.26 ovocitos por ovario ($p > 0.05$), así como 2.46 y 2.08 ovocitos de calidad por ovario ($p > 0.05$), respectivamente. Llegando a la conclusión de no encontrar diferencia en el uso de las dos técnicas para la obtención de ovocitos puesto proveen similares calidades para MIV Y FIV.

Flores F. (12), comentó en respecto a colección, cultivo y maduración in vitro, de ovocitos de vacas (*Bos taurus*) en el altiplano boliviano, donde su objetivo fue determinar el efecto de la técnica de recuperación, medio de recuperación y maduración de la capa de cumulus oophorus con aspiración y slicing, donde se obtuvieron con uso de aspiración en categoría A 40 (7.84%), B 119 (23.33%), C 129 (25.29%), con técnica de slicing se obtuvieron datos en categoría A 39

(7.65%), B 104 (20.39%), C 79 (15.49%), con medio de maduración M-199+BSA. Se logró obtener en categoría A 44 (8.63%), B 124 (24.31%), C 90 (17.65%). Los ovocitos obtenidos por aspiración solo maduraron 172 (34.61%), no maduraron 113 (22.74%), con técnica slicing maduraron 145 (29.18), no maduraron 67 (13.48%). Llegando a la conclusión de que la recolección de ovocitos con técnica de slicing y aspiración y medios de recuperación M-199+BSA tienen el mismo comportamiento, pero la técnica de slicing y aspiración estadísticamente más elevados para obtener categoría A y B.

Chura L. (13). En un estudio cuyo objetivo fue evaluar el efecto de las hormonas GnRH y LH en la maduración y fertilización in vitro de ovocitos inmaduros obtenidos de vacas Brown Swiss sacrificadas en el matadero, donde se utilizaron 225 ovocitos, el medio base fue TCM-199, se conformaron tres tratamientos con tres repeticiones cada una: T1 sin hormonas; T2 con 0,8mg/ml de GnRH y T3 con 1mg/ml de LH. Los resultados obtenidos indican que se obtuvo un 20% de ovocitos maduros en el tratamiento 2 y un 28% en el tratamiento 3. Lo cual nos demuestra que hubo un mayor número de ovocitos madurados respecto al grupo control en la cual solo se obtuvo un 4% de ovocitos maduros. Por lo que se concluye que la adición de estas hormonas al medio de maduración induce a una mayor tasa de maduración in vitro de ovocitos bovinos.

Tinco *et al* (14). Realizaron un investigación sobre la calidad de ovocitos y condición corporal en vacas criollas. El objetivo de este estudio fue evaluar la cantidad, calidad y estado nuclear de los ovocitos de ovarios según condición corporal de las vacas criollas. Se formó grupos de vacas según condición corporal (1=emaciada, 5=obesa): baja ($\leq 1,5$), moderada (2 a 2,5) y alta (≥ 3). Los ovarios

(n=212) fueron obtenidos de vacas criollas del matadero. Los ovocitos se recuperaron mediante aspiración folicular clasificando en categorías A, B y C, colocándose una parte con etanol-ácido acético (3:1) por 24 h, luego teñidos con Lacmoid al 2%. Se evaluó el estado nuclear del ovocito, categorizando como vesícula germinal intacta (GV) y vesícula germinal rota (GVBD). El número de ovocitos recuperados por ovario entre condición corporal baja, moderada y alta de vacas fueron similares ($p > 0,05$). Hubo asociación entre condición corporal y calidad de ovocitos de categoría A ($r_s = 0,49$; $P = 0,001$), B ($r_s = 0,16$; $p = 0,018$); C ($r_s = -0,16$; $p = 0,016$). Se obtuvieron mayor porcentaje ($p \leq 0,05$) de ovocitos de categoría A y B en las de condición corporal moderada y alta, como categoría C en condición corporal baja. La condición corporal no influyó ($p > 0,05$) sobre el estado nuclear del ovocito. No se encontró asociación ($p = 0,073$) entre condición corporal y ovocitos con GV intacta, ni con GVBD ($p = 0,737$). Se concluye, que la condición corporal se asocia con la calidad de los ovocitos de categoría A, B y C, mas no con el estado nuclear GV y GVBD en vacas criollas del matadero.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Biotecnologías Reproductivas en Bovinos

Son un conjunto de técnicas reproductivas que tiene el objetivo de mejorar genéticamente los individuos que se tiene, esto implica el progreso genético, mantención y preservación del material genético. También implica grandes riesgos en nuevas técnicas (2). Algunas de las biotecnologías que se inició y se fueron desarrollando en 1908 en Europa, todas ellas pasaron por olas generacionales que les permitió descubrir una técnica mientras desarrollaban otra, así mismo se apoyan de una técnica como por ejemplo, la Maduración In

Vitro, después la Fertilización In Vitro para llegar a la Producción In vitro, las dos primeras tienen sus puntos críticos de desarrollo, donde la manipulación es crucial para llegar al objetivo final, volviendo a las biotecnologías pues se desarrollaron las siguientes biotecnologías:(2)

- Inseminación artificial y congelación de semen
- Eliminación y disminución de enfermedades sexuales
- Uso intensivo de un macho de alto valor genético
- Aumento de la eficiencia de la estimación del valor genético (test de progenie)
- Sincronización e inducción de la ovulación
- Aumento de la eficiencia de la producción de terneros
- Aumento de la eficiencia del manejo productivo y reproductivo
- Superovulación, transferencia y congelación de embriones
- Uso intensivo de la hembra de alto valor genético
- Recuperación más eficaz de individuos exóticos y razas en peligro de extinción
- Formación de bancos de germoplasma
- Importación y exportación de material genético
- Micromanipulación de embriones para producir mellizos homocigotas y quimeras
- Aumento del número de animales nacidos por embrión
- Aumento de la eficiencia del valor genético
- Creación de modelos óptimos de experimentación
- Determinación y selección del sexo de embriones y espermatozoides
- Producción de la descendencia con el sexo seleccionado
- Producción in vitro de embriones

- Uso de hembras que no responden a tratamientos superovulatorios
- Producción de embriones con ovarios de matadero
- Uso experimental
- Clonado de animales por medio de transferencia nuclear
- Eliminación de la variabilidad de genotipos individuales

2.2.2 Ovogénesis:

Todo ser vivo en su tiempo de gestación se está proliferando células germinales para el desarrollo de la estructura anatómica que lo caracteriza según a su especie, donde las células germinales se desarrollan en ovogonios. Este proceso de folículoogénesis es primordial para las hembras pues ellas contarán con un pool de ovocitos que se utilizarán en toda su vida reproductiva. (15)

Para una mejor comprensión en la etapa inicial las células germinales que migran a la cresta germinal para convertirse en un futuro ovario, el futuro ovario contiene a los ovogonios (9). Hay una primera mitosis como resultado obtenemos un ovocito primario, este hecho es una maravilla en la naturaleza puesto que detendrá cuando nace la hembra y en la ovulación. En la pubertad con el primer celo de la hembra, se da el inicio de la segunda división, como producto final tenemos a un ovulo listo para ser fecundado.(15)

2.2.3 Folículoogénesis:

Folículos primordiales:

El folículo primordial se refiere al ovocito primario que se encuentra detenido en la profase de la primera división meiótica (16). Se encuentra rodeado por una

capa de células planas denominadas pre-granulosas, en el bovino el folículo primordial mide de 30-50 μm .

Folículos primordiales

Los folículos que se encuentran van a desarrollar las células planas y convertirlas en cubicas, la teca interna comienza su diferenciación y al folículo de le denomina primario (15). Este desarrollo es por un aspecto hormonal, llamado reclutamiento gracias a la acción de la hormona FSH, no todos los folículos primarios llegan a madurar, en este proceso el folículo mide de 40 – 60 μm en bovino (16)

Folículos secundarios o preantrales

Las células epiteliales comienzan a crecer, proliferando las células, tomando un tamaño mayor, esto influenciado por las hormonas segregadas de las gonadotropinas hipofisarias (9). En los folículos bovinos tienen el tamaño de 150 μm , algunos de desarrollar otros se atresiarán. (16)

Crecimiento de folículos primordiales

En el crecimiento, los folículos tomaron un tamaño, pero es quien se va distinguir de todos es el folículo dominante, es quien llegara a la ovulación gracias a la LH, en los demás folículos gobernara de manera negativa para que se atresian. (15)

2.2.4 Diámetro folicular

Según algunos estudios menciona que se prefieren el diámetro del folículo de 2-6 mm, pero también que hay folículos con diámetro de 6 mm son los más disponibles para desarrollo embrionario en calidad de blastocito. Los folículos extraídos con diámetro de 2-8 mm son los más ideales para el desarrollo embrionario, presentando mejor capacidad meiótica, donde los menos eficientes son menores a 2 mm. (10)

2.2.5 Maduración in Vitro

Proceso de la Producción In vitro, es una de las etapas más críticas, es aquí el éxito del trabajo de las biotecnologías (9) (17) . Debemos considerar que un primer período de crecimiento y segundo un período final de preparación nuclear y citoplasmática, requisito para una fecundación y desarrollo embrionario. Cuando el folículo antral alcanza un tamaño de 1,8 mm en la vaca, termina el crecimiento del ovocito. (16)

2.2.6 Recuperación de ovocitos para maduración in vitro

Existen múltiples maneras de la recuperación de un ovocito, el primero es la técnica OPU, que consiste en la sincronización de celo, un programa de súper estimulación, ingreso vía transvaginal y ecógrafo, que lleva una aguja de punta roma para poder aspirar los folículos que se encuentran, por lo cual como el ovario la presión es negativa, lo que se realiza es ingresar un lavado que es un medio enriquecido sintético para la colecta de los ovocitos. (2)

Va influenciar muchos aspectos como la raza, condición corporal, factor humano quien manipule puesto son pocos los especialistas en realizar este tipo de trabajo, manera de succión, líquidos sintéticos a emplear y no menos importante pero el tema fisiológico en que se encuentra el animal que se va a trabajar. (4)

Obtención de ovocitos provenientes de camal

Se realiza a partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de los folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm. (13). Esta técnica suministra una fuente abundante de ovocitos obtenidos a bajo costo, provenientes de animales en diferentes estados de ciclo

estral, que pueden ser madurados, criopreservados, fertilizados y cultivados in vitro hasta alcanzar estados avanzados de desarrollo embrionario. (14).

Así mismo el uso del material genético que tiene las hembras bovinas que no se puede desperdiciar, son técnicas muy viables, en ellas encontramos la técnica Slicing y Aspiración. (6)

2.2.4 Búsqueda y clasificación de COCs

La búsqueda de ovocitos se debe realizar similar al de los embriones, bajo una lupa estereoscópica (40X) , siendo la morfología del citoplasma y las células de los cúmulos, los mejores indicadores para determinar si el ovocito posee potencial para madurar y fecundar in vitro (12). Se señala que la calidad intrínseca de los ovocitos está ligado a la eficiencia de la producción de embriones in vitro. (14) indican que la prueba final de la calidad de un ovocito es su habilidad para estar fertilizado, y desarrollar hasta la etapa del blastocito, capaz de establecer una gestación y finalmente producir a un ternero vivo.(15)

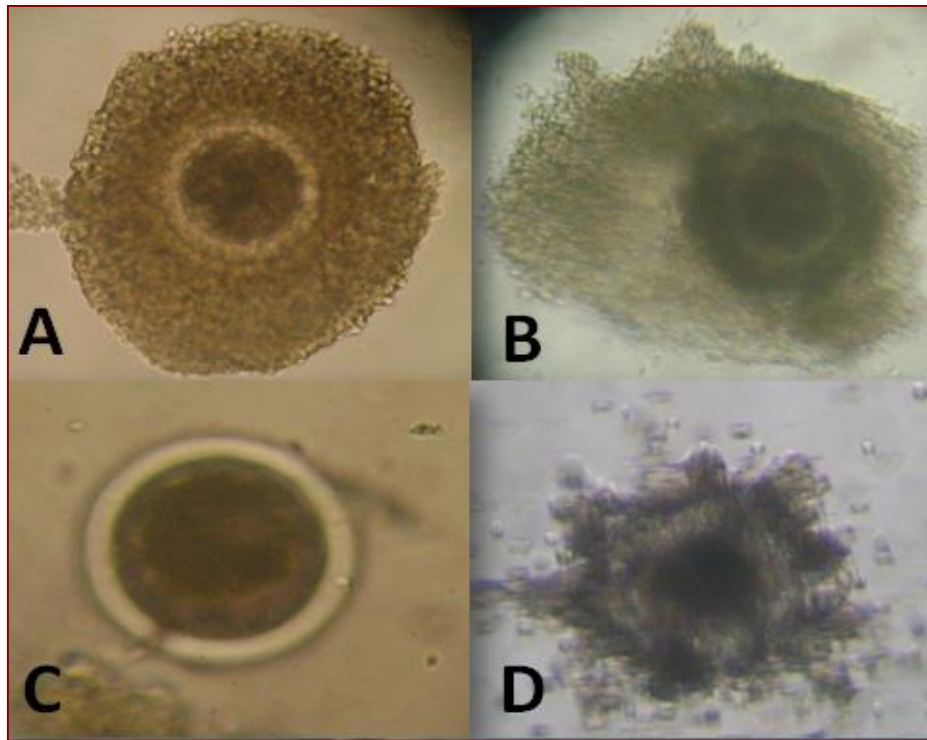
Tabla 1: Características de la calidad de los ovocitos Blondin y Sirad.

| Ovocito | Característica |
|----------------|---|
| 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 de cúmulo, con citoplasma homogéneo |

| | |
|---------------|---|
| Tipo D | Ovocito maduro, sin células de cúmulo, con el citoplasma homogéneo. |
|---------------|---|

Fuente: Blondin y Sirad (18)

Figura N° 1: Clasificación de la calidad de los ovocitos



Fuente: Ancco E. (19)

2.3 Marco Conceptual

Maduración de ovocito: Condiciones en laboratorio, que se da en una placa Petri, utilizando medios de maduración sintéticos. (20)

Ovocito: célula reproductiva propio de la hembra, que sufre cambios hormonales para poder convertirse en un ovulo y poder ser fertilizado.(21)

Folículo ovárico: estructura ovárica que contiene al óvulo (22)

Diámetro folicular: célula sexual que puede ser fertilizada.(23)

Complejo cúmulo ooforo: capas de células cilíndricas alrededor del ovocito (24)

Técnica de aspiración: proceso de ingreso de una aguja para la succión de los ovocitos que se encuentran en su interior. (25)

Técnica de slicing: proceso de corte de manera longitudinal y transversal para la salida de los folículos en su interior. (25)

HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.3 Hipótesis General

Hi:

La maduración in vitro de ovocitos bovinos a diferentes tiempos y colectados de folículos de diferente tamaño presentan diferencias en su capacidad de desarrollo en condiciones de Sierra-2021

Ho:

La maduración in vitro de ovocitos bovinos a diferentes tiempos y colectados de diferente tamaño no presentan diferencias en su capacidad de desarrollo en condiciones de Sierra-2021

2.4 Hipótesis Especificas

Hi:

Hay un efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos en condiciones de Sierra - 2021

Ho:

No hay un efecto del tiempo de maduración sobre la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos en condiciones de Sierra - 2021

Hi:

El diámetro folicular de 2-4mm y 5-8 mm tiene efecto sobre la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos en condiciones de Sierra – 2021

Ho:

El diámetro folicular de 2-4mm y 5-8 mm no tienen efecto sobre la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos maduros en condiciones de Sierra – 2021

Hi:

Hay un efecto de la técnica de obtención de ovocitos bovinos sobre la capacidad de maduración in vitro en condiciones de Sierra- 2021

Ho:

No hay un efecto de la técnica de obtención de ovocitos bovinos sobre la capacidad de maduración in vitro en condiciones de Sierra- 2021

Variables

Variable de estudio:

- Cantidad de ovocitos totales
- Cantidad de ovocitos viables (A y B)
- Cantidad de ovocitos no viables (C y D)
- Cantidad de ovocitos madurados

Factores evaluados en el estudio

- Tiempo de Maduración a 18, 20, 22, 24 Horas
- Tamaño de folículos de 2-4mm y 5-8mm
- Técnica de slicing y aspiración

Operacionalización de Variables

| Variables | Tipo de variable | Definición conceptual | Dimensión | Indicador | Instrumento | Escala |
|---|-------------------------|---|------------------|----------------------------|--------------------|---------------|
| Tasa de maduración in vitro de ovocitos por 18 horas | Cuantitativa discreta | La tasa de maduración se define como el total de ovocitos madurados presentes sobre el número de ovocitos recuperados por sesión multiplicado por 100 | 0 a 100 % | Porcentual Sesión x 100 | Calculadora | Numeral |
| Tasa de maduración in vitro de ovocitos por 20 horas | Cuantitativa discreta | La tasa de maduración se define como el total de ovocitos madurados presentes sobre el número de ovocitos recuperados por sesión multiplicado por 100 | 0 a 100 % | Porcentual Sesión x 100 | Calculadora | Numeral |
| Tasa de maduración in vitro de ovocitos por 22 horas | Cuantitativa discreta | La tasa de maduración se define como el total de ovocitos madurados presentes sobre el número de ovocitos recuperados por sesión multiplicado por 100 | 0 a 100 % | Porcentual Sesión x 100 | Calculadora | Numeral |
| Tasa de maduración in vitro de | Cuantitativa discreta | La tasa de maduración se define como el total de ovocitos madurados | 0 a 100 % | Porcentual Sesión x 100 | Calculadora | Numeral |

| | | | | | | |
|---|-----------------------|--|----------|-------------|-------------|---------|
| ovocitos por 24 horas | | presentes sobre el número de ovocitos recuperados por sesión multiplicado por 100 | | | | |
| Maduración de folículos de 2-4mm | Cualitativa continua | Estructuras del ovario que tienen como componente líquido folicular para su crecimiento y maduración | 2 a 4 mm | milímetros. | Ecógrafo | Numeral |
| Maduración de folículos de 5 a 8 mm | Cualitativa continua | Estructuras del ovario que tienen como componente líquido folicular para su crecimiento y maduración | 4 a 8 mm | milímetros. | Ecógrafo | Numeral |
| Tasa de recuperación de ovocitos por técnica slicing | Cuantitativa continua | Técnica que se ejecuta al cortar el ovario con un bisturí y permitiendo la salida de los ovocitos | % | porcentual | Calculadora | Numeral |
| Tasa de recuperación de ovocitos por técnica de aspiración | Cuantitativa continua | Técnica que se ejecuta al ingresar la aguja y absorber los folículos | % | porcentual | Calculadora | Numeral |

III. METODOLOGÍA

3.1 Método de investigación

Como método general se utilizó el método científico. El Método científico es un método sistemático y ordenado que consiste en formular preguntas que fueron respondidas por hipótesis y luego probadas, contrastadas, verificadas mediante un diseño riguroso. (26)

El método específico que utilizamos en la investigación fue la deducción así mismo de análisis que vamos a realizar (16)

3.1.1 Tipo de Investigación

El presente estudio se ubicó en la investigación aplicada que busca mejorar la situación o solución de un problema con la finalidad de generar bienestar en la sociedad. Además, es de carácter prospectivo. (16)

Es longitudinal por que se analizaron los cambios a través del tiempo en puntos críticos o periodos especificados para hacer deducciones respecto al cambio, sus determinantes y consecuencias (27)

3.1.2 Nivel de Investigación

Explicativo puesto está dirigido a responder los eventos y fenómenos físico o sociales que se desconocen o tienen poco conocimiento (16).

3.1.3 Diseño del Estudio

El presente estudio tiene un diseño cuasi-experimental, su grafica de modelo es:

$$\begin{array}{l} M_{1c} \cdots \cdots O_1 \rightarrow X \rightarrow O_2 \\ M_{2c} \cdots \cdots O_2 \rightarrow \quad \rightarrow O_2 \end{array}$$

Donde:

M_{1c} = Grupo muestral 1 (grupo experimental)

Sin asignación aleatoria de elementos

M_{2c} = Grupo muestral 2 (grupo control)

Sin asignación aleatoria de elementos

O_1 = Observaciones antes de la intervención

O_2 = Observaciones después de la intervención

$X =$ Intervención o tratamiento

3.2 Población

La población fue infinita puesto no conocemos la cantidad de ovocitos que puede contener un ovario, además se va ver influenciado por el ciclo estral que se encuentre la vaca, edad, y por la cantidad de animales beneficiados.

3.3 Muestra:

Nuestra muestra fue de 77 ovocitos por cada tratamiento y elegida a través de un muestreo no probabilístico intencional, que son muestras dirigidas, que suponen una selección del investigador de las características que desea investigar (16)

3.3.1 Criterios de Inclusión

- ✓ Ovocitos de todas las calidades (A, B, C y D) colectados de folículos de 2 a 8 mm de diámetro.

3.3.2 Criterios de Exclusión

- Ovocitos colectados de folículos mayores a 8 mm de diámetro

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica es una etapa que consiste en recolectar los datos pertinentes, atributos, conceptos y variables de las unidades de análisis (17). Por lo cual utilizamos la observación, que se realizó en los diversos tratamientos y procedimientos, así mismos el uso de trabajos como tesis, artículos científicos que tuvieron relación con nuestra investigación.

Los instrumentos para la recolección de los datos que se utilizó fue una ficha donde se menciona el tipo de medio de maduración, obtención del folículo, el uso de técnica slicing y aspiración, tiempos de maduración, calidad del ovocito. Todo ello para medir las variables y obtener datos correspondientes a nuestra investigación.

3.4.1 Procedimientos específicos

Variable diámetro:

Clasificación de tamaño de los folículos:

- Se procedió con la ayuda de un ecógrafo a realizar la medición del diámetro de los folículos procedentes del camal.

Variable técnica slicing y aspiración:

Colección de Ovocitos mediante técnica slicing

- Se ingresó al camal, en día de faenado, en el área de desvicerado se procedió a recolectar los ovarios, debemos tener cuidado en la manipulación del ovario para evitar su daño, también debemos retirar máximo 30 minutos, puesto es el tiempo de vida que tienen.
- Se colocaron los ovarios en un recipiente a 37° en un recipiente con cloruro de sodio.
- Se procedió a cortar con un bisturí N° 22 de manera transversal y longitudinal, los folículos se colocaron en una placa Petri con suero fosfatado.
- Se realizó la selección de los ovocitos de nivel A, B, C y D con ayuda del microscopio estereoscopio de 20x40.

Colección de Ovocitos de ovarios con técnica aspiración

- Se tomaron los ovarios en el día de faenamiento, se colocaron en un recipiente a temperatura de 37° con suero fisiológico para ser transportado a laboratorio.
- La colecta de los ovocitos se realizó mediante punción y aspiración con una jeringa de 3 ml y aguja N° 18, el fluido aspirado será colocado

en placas Petri conteniendo medio PBS (suero fosfatado) para su posterior búsqueda y clasificación

Búsqueda y clasificación de ovocitos en laboratorio

Su búsqueda fue con el uso de un Microscopio estereoscopio, se clasificó los ovocitos en categoría A, B, C y D, aquí se podrá apreciar los cumulus oophorus. Los (COCs) se clasificaron como viable que son el A y B, así como inviable C y D.

Variable tiempo de maduración:

Maduración in vitro (MIV)

Los ovocitos seleccionados de calidad A y B se colocaron individualmente en placas Petri, posteriormente se lavaron 2-3 veces en medio H-199 (Hepes). Luego los ovocitos se lavaron 2-3 veces en gotas de 100 µl en placas Petri con medio MIV (Vitrogen, Brasil) y fueron transferidas a placas Petri de 35 x 10 mm, con gotas de maduración de 70 µl cubiertas con aceite mineral, previamente atemperado en la incubadora. Las placas Petri fueron preparadas con las gotas de maduración de 70 µl y 10 ovocitos por gota, y fueron colocados en la incubadora a 38.5°C, 5% de CO₂ y 90% humedad por 18-20-22 y 24 horas

3.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

El análisis de los datos fue a través de estadística descriptiva y estadística inferencial a través de análisis de varianza con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x2x2. Donde son en 4 tiempos de 18,20,22,24

horas de maduración in vitro, con dos técnicas que fueron aspiración y slicing; con dos diámetros foliculares de 2-4mm y 5-8mm,

El diseño estadístico fue el diseño completamente al azar cuyo modelo aditivo lineal fue el siguiente:

a. Modelo aditivo lineal

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : es la variable de respuesta.

μ : es la media global

t_i : es el efecto del i-ésimo tratamiento.

ϵ_{ij} : error asociado i-ésimo tratamiento (error experimental)

Todos los datos fueron analizados mediante al software SPSS V29 y el SAS V8, asimismo se realizó una prueba de DUNCAN

3.6 Aspectos éticos de la investigación

Como investigador me comprometí a respetar los principios y normas de comportamiento del código de ética para la investigación científica de la Universidad Peruana los Andes, mencionadas en el reglamento de investigación, mencionando el Artículo 27:

Beneficencia y no maleficencia: tratando de minimizar los efectos adversos

Responsabilidad: En la realización de la investigación

Veracidad: Los datos presentados no fueron manipuladas, ni modificada, mostrándose los resultados tal cual.

Artículo 28:

Ejecutar investigaciones pertinentes, originales y coherentes con las líneas de investigación Institucional.

Proceder con rigor científico asegurando la validez, la fiabilidad y credibilidad de sus métodos, fuentes y datos.

Asumir en todo momento la responsabilidad de la investigación, siendo conscientes de las consecuencias individuales, sociales y académicas que se derivan de la misma

IV. RESULTADOS Y/O PRUEBA DE HIPOTESIS

Los resultados del estudio se presentan basados en la evaluación de las variables y de acuerdo a los objetivos planteados. Se presentan los resultados sobre el efecto de la triple interacción de la técnica, diámetro y horas de maduración sobre la cantidad de ovocitos madurados

4.1.1 Evaluación del efecto de la triple interacción de la técnica, diámetro folicular y horas de maduración sobre la cantidad de ovocitos madurados:

Los resultados obtenidos en la tabla N°2, que si presenta una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), donde con la técnica Aspiración, de diámetro de 2-4mm y madurado a 22-24 horas se obtiene una óptima cantidad de ovocitos madurados. Esto se puede apreciar en el Figura N°2, donde se puede apreciar el promedio de los ovocitos madurados, con las horas y las técnicas de recolección (Aspiración y Slicing) en cada barra.

Tabla N° 2: Efecto de la triple interacción de la técnica, diámetro y horas de maduración sobre la cantidad de ovocitos madurados.

| Horas | Técnica | Diámetro | Ovocitos madurados | P Valor |
|-------|---------|----------|--------------------|---------|
| 18 | A | 2-4mm | 14.5 ± 0.70gf | 0.0001 |
| | | 5-8mm | 6.5 ± 0.70h | |
| | S | 2-4mm | 14 ± 1.41gf | |
| | | 5-8mm | 22 ± 1.41cb | |
| | A | 2-4mm | 32.5 ± 0.70a | |
| | | 5-8mm | 16.5 ± 2.12ef | |
| 20 | S | 2-4mm | 6.5 ± 0.70h | |
| | | 5-8mm | 11.5 ± 0.70g | |

| | | | |
|----|---|-------|---------------|
| | | 2-4mm | 16.5 ± 2.12ef |
| | A | 5-8mm | 22.5 ± 0.70cb |
| | | 2-4mm | 18 ± 2.82ef |
| 22 | S | 5-8mm | 15.5 ± 2.12ef |
| | | 2-4mm | 23.5 ± 2.12b |
| | A | 5-8mm | 20 ± 1.41cd |
| | | 2-4mm | 15.5 ± 1.41ef |
| 24 | S | 5-8mm | 6.0 ± 0.85h |

*a, b, c, d, e, f, g, h letras diferentes indica que hay diferencia estadística significativa (P<0.05)

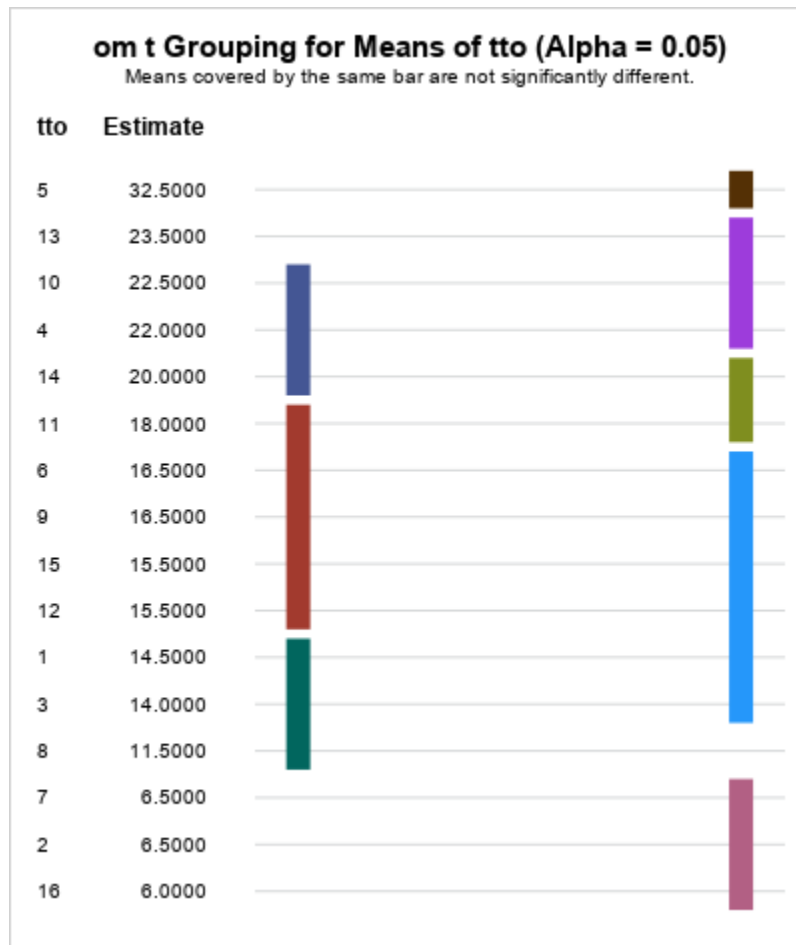


Figura N° 2: Efecto de la triple interacción de la técnica, diámetro y horas de maduración sobre la cantidad de ovocitos madurados

4.1.2 Evaluación del efecto del tiempo de maduración sobre la cantidad de ovocitos madurados:

Se presentaron los siguientes resultados, respecto al efecto del tiempo de maduración, por lo cual para la maduración se utilizaron solo los ovocitos viables, ya que contaban con las características morfológicas para la maduración in vitro. Según los resultados en la Tabla N°3 si presenta una diferencia estadística ($p=0.0018$), respecto a las horas de maduración que fueron sometidas los ovocitos viables. De las cuales la más óptima para la maduración in vitro en la Región Junín que se ubica a 3230 msnm, es de 22 horas y 24 horas. Este dato también se puede apreciar en el Figura N°3, donde se puede apreciar la maduración in vitro de 18 horas 14.2 ± 6.4 ; 20 horas con ovocitos madurados de 16.7 ± 11.1 ; (22 horas) con ovocitos madurados 18.12 ± 3.5 ; 24 horas con ovocitos madurados de 16.2 ± 6.84 .

Tabla N°3: Efecto del tiempo de maduración sobre la cantidad de ovocitos madurados

| Horas | Ovocitos madurados | P valor |
|----------|--------------------|---------|
| 22 horas | $18.12 \pm 3.5a$ | 0.0018 |
| 20 horas | $16.7 \pm 11.1ab$ | |
| 24 horas | $16.2 \pm 6.84b$ | |
| 18 horas | $14.2 \pm 6.4c$ | |

*a, b, c letras diferentes indica que hay diferencia estadística significativa ($P<0.05$)

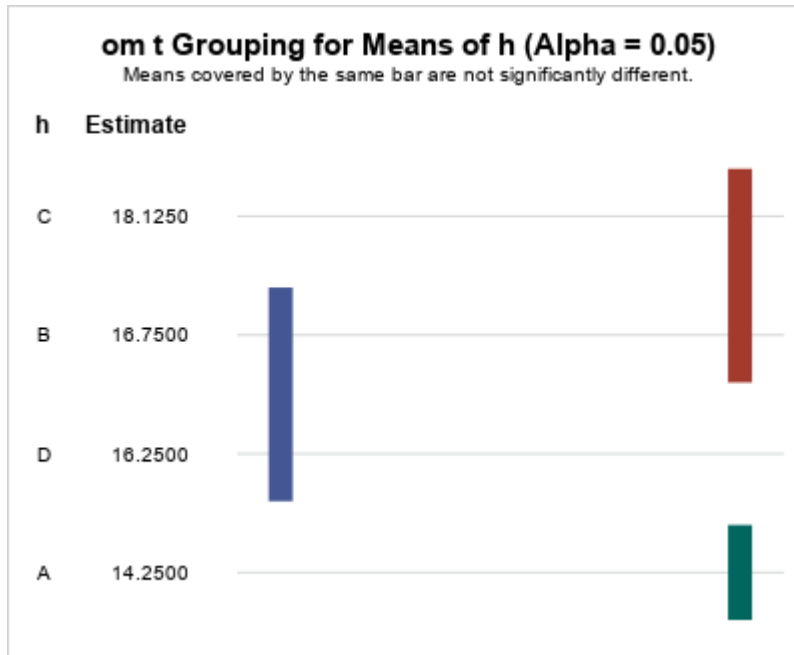


Figura N°3: Efecto del tiempo de maduración sobre la cantidad de ovocitos madurados

4.1.3 Evaluación del efecto del diámetro folicular sobre la cantidad de ovocitos madurados:

Los resultados obtenidos fueron los siguientes, que se puede apreciar en la Tabla N°4, donde los ovocitos de diámetro 2-4 mm llegaron a madurar óptimamente frente a los ovocitos con diámetro de 5-8 mm, mostrando que si presenta una diferencia estadística significativa ($p=0.04$). Asimismo, en el Figura N°4, se puede apreciar las diferencias, en las barras, con los promedios obtenidos de (I) 2-4mm obteniendo 17.6 ± 9.13^a y (II) 4-8mm obteniendo $15.0 \pm 6.81b$.

Tabla N° 4: Efecto del diámetro folicular sobre la cantidad de ovocitos madurados

| Diámetro | Total de madurados | Ovocitos madurados | P valor |
|----------|--------------------|--------------------|---------|
| 2-4 mm | 142 | 17.6 ± 9.13a | 0.04 |
| 5-8 mm | 127 | 15.0 ± 6.81b | |

*a,b letras diferentes indica que hay diferencia estadística significativa (P<0.05)

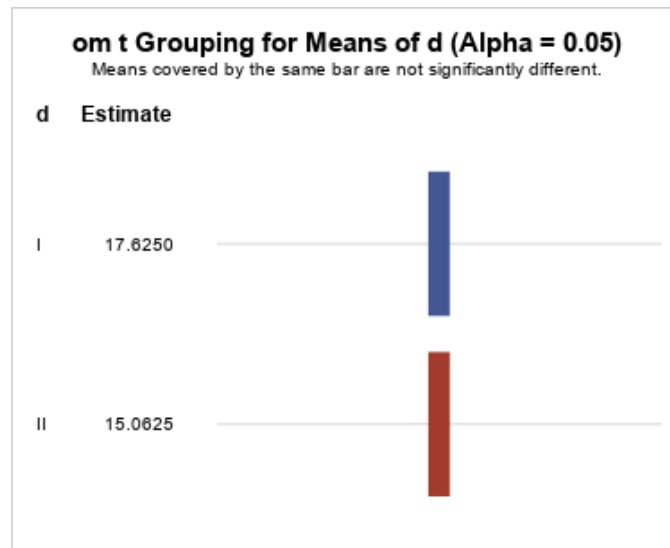


Figura N°4: Efecto del diámetro folicular sobre la cantidad de ovocitos madurados

4.1.4 Evaluación del efecto de la técnica de Aspiración y Slicing sobre la cantidad de ovocitos madurados:

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes, donde respecto a la técnica de Aspiración sobre la cantidad de los ovocitos madurados, frente a la técnica de Slicing si presenta una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), de las cuales nos muestra que la técnica de aspiración es la más óptima, para la maduración in vitro, que se evidencia en la Tabla N°5, en el Figura N°5, muestras las diferencia en las barras para la técnica

Aspiración obteniendo un promedio de maduración de 19.0 ± 7.55 y para la técnica de Slicing se obtuvo un promedio de 13.2 ± 5.97 .

Tabla N°5: Efecto de la técnica de Aspiración y Slicing sobre la cantidad de ovocitos madurados

| Técnica | Ovocitos madurados | P valor |
|------------|--------------------|---------|
| Aspiración | 19.0 ± 7.55 a | 0.001 |
| Slicing | 13.2 ± 5.97 b | |

*a,b letras diferentes indica que hay diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

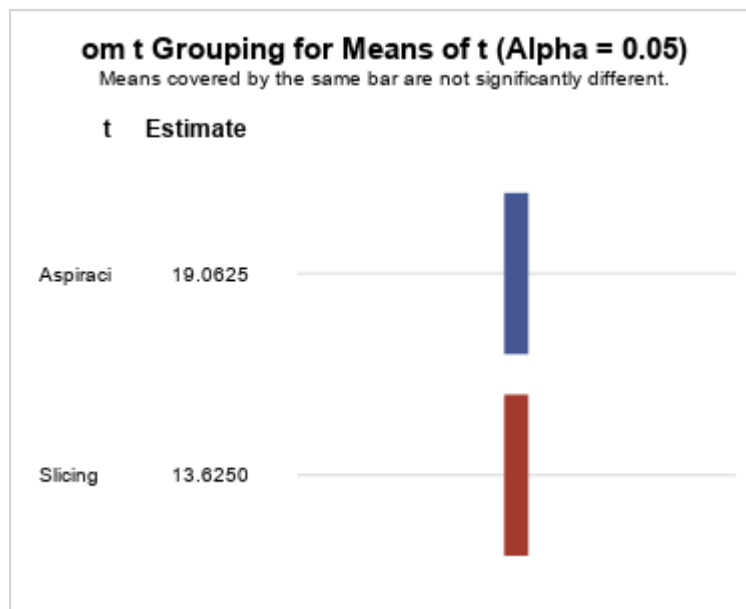


Figura N°5: Efecto de la técnica de Aspiración y Slicing sobre la cantidad de ovocitos madurados

V. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la investigación llegamos al siguiente resultado para la triple interacción con un valor de $p=0.001$, que con la aplicación de la técnica Aspiración, de diámetro folicular de 2-4mm y maduración in vitro de 22-24 horas se obtiene una óptima cantidad de ovocitos madurados en condiciones de Sierra, realizado por primera vez en nuestra Región Junín. Para la variable maduración in vitro a diferentes tiempos (18, 20, 22, 24 horas), los resultados obtenidos si presenta una diferencia estadística significativa ($p<0.05$), Díaz (7) halló que a las 24 horas de maduración obtuvo una tasa de maduración de 74.19% frente a las de 18 horas con 73.53%, Landinez (28) halló entre < 24 y >24 horas de maduración, obteniendo una tasa de maduración de 67.8%, Delgado (9) obtuvo los resultados que a 24 horas obtuvo un promedio de maduración del 57.78%, Flores (12) obtuvo una tasa de maduración a 24 horas un promedio de 34.61%, Vázquez (29) obtuvo una tasa de maduración a 24 horas un promedio de 79.18%. Para la variable diámetro, siendo el diámetro más favorable para la maduración in vitro en distintos tiempos de maduración es de 2-4 mm, como lo menciona Estrella (5), en su investigación donde el G1 (<4 mm), G2 (4-8mm), G3 (>8 mm) siendo 4-8 mm quienes culminan y presentan mayor tasa de maduración. Este dato también concuerda con Segura (10) donde la capacidad de maduración más altos con los ovocitos que presentaron un diámetro de 1-4 mm. Gomez (11) utilizo los diámetros de 2-8mm para la maduración in vitro. Respecto a la variable técnica respecto a la capacidad de maduración in vitro si presenta diferencia significativa ($p=0.001$), donde se obtuvo que con la técnica de aspiración 19.0 ± 7.55 de ovocitos madurados y con la técnica de slicing 13.2 ± 5.97 de ovocitos madurados, siendo el más óptimo utilizar la técnica de aspiración, estos datos también los contrasta

Hernández (8) que tienen una tasa de ovocitos viables con la técnica de aspiración $73,49 \pm 24,54$; con la técnica de slicing $65,17 \pm 10,52$ de maduración de ovocitos, Gomez (11) respecto a la obtención de ovocitos respecto a la técnica de slicing obtuvo un promedio de ovocitos madurados de 46.31% y con la técnica de aspiración obtuvo un promedio de ovocitos madurados de 48.83%. Caso contrario menciona Quintana (25) que con la técnica de slicing se obtuvo mayor cantidad de ovocitos 46.80% y menor con la técnica de aspiración con 34.25% presentando una diferencia significativa ($p < 0.001$)

CONCLUSIONES

- La capacidad de maduración in vitro de bovinos a diferentes tiempos, y colectados de folículos de diferentes tamaños si presentan diferencia significativa ($p=0.001$), utilizando el tiempo de maduración in vitro de 22-24 horas, con diámetro folicular de 2-4mm con la técnica de aspiración.
- La capacidad de maduración in vitro bovino a diferentes tiempos tienen mejores resultados de 22 horas con un promedio de maduración in vitro de 18.12 ± 3.5 y 24 horas con un promedio de maduración de $16.2 \pm 6.84b$, con un valor de $p=0.001$
- El diámetro folicular que tiene efecto sobre la capacidad de maduración in vitro es de 2-4 mm, con un promedio de maduración de 17.6 ± 9.13 , con un valor de $p=0.04$
- La técnica de aspiración tiene efecto sobre la capacidad de maduración in vitro con un promedio de maduración de 19.0 ± 7.55 , con un valor de $p=0.001$

RECOMENDACIONES

- Se recomienda seguir con las investigaciones de capacidad de maduración ya que es un punto más crítico para poder llegar a la producción in vitro.
- Asimismo, se recomienda que se debe apostar más por las biotecnologías reproductivas que favorecen mucho a la población.
- Se recomienda para poder tener mayor cantidad de ovocitos madurados deben tener 2-4 mm de diámetro.
- Se recomienda el uso de la técnica de aspiración para la obtención de mayores ovocitos de categorías A y B.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burrola M, González E. Efectos de los RNAm maternos sobre la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario temprano en mamíferos. *Rev Mex Ciencias Pecu.* 2015;6(1):39.
2. Palma G, Brem G. Biotecnología de la Reproducción [Internet]. Biotecnología de la Reproducción. 2001 [cited 2021 May 25]. p. 1–19. Available from: http://www.reprobiotec.com/libro_azul/cap_01.pdf
3. Eslava P. Impacto económico y social del uso de semen sexado nacional en la ganadería bovina del Perú [Internet]. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2014. Available from: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2379/L10-E84-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. Segura J, Montes R. Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. 2001 [cited 2021 May 26];12(3):196–206. Available from: <http://www.uady.mx/~biomedic/rb011237.pdf>
5. Estrella C, Suconota A. Viabilidad y morfología de ovocitos bovinos de ovarios de matadero de acuerdo al diámetro folicular [Internet]. 2018. 23–25 p. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/30082/1/Trabajo de titulacion.pdf>
6. Saleh W. Assessment of different methods of bovine oocytes collection, maturation and in vitro fertilization of abattoir specimens. *Iraqi J Vet Sci.* 2017;31(1):55–65.
7. Diaz S. Efecto del tiempo de maduración in vitro de los oocitos bovinos sobre el porcentaje de blastocistos obtenidos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano. 2017;29. Available from: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6093/1/CPA-2017-044.pdf>
8. Hernández A, Nava H, Vílchez V. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración in vitro [Internet]. Vol. 3, Producción

Agropecuaria/ Sanidad Animal. 2010 May [cited 2021 May 25]. Available from:
<http://www.unesur.edu.ve/unidades/investigacion/revistas.html>

9. Delgado R. Maduración in vitro de Ovocitos en Metafase II de vacas post mortem a través de la técnica de fijación. [Internet]. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2017 [cited 2021 May 25]. Available from:
<https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2942/L53-D4-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
10. Segura Portocarrero G. Evaluación in Vitro De La Capacidad De Maduración Y Desarrollo Embrionario De Ovocitos Bovinos Extraídos De Folículos De Tres Diámetros Diferentes. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; 2016.
11. Gómez E, Alva G, Huillcas F, Salinas D. Técnicas del slicing y aspiración folicular en la eficiencia de la recuperación de ovocitos bovinos criollos postmortem en el camal. 2012;2(August 2012):38–9.
12. Flores F. Colección, cultivo y maduración in vitro de ovocitos de vacas en el Altiplano Boliviano. Universidad Nacional del Antiplano; 2012.
13. Chura Chura EL. Evaluación y Efecto de la GNRH y LH en la maduración y Fertilización in vitro de ovocitos recolectados de vacas Brown Swiss post mortem en la región Puno [Internet]. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2011. Available from:
<http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/1073%0Ahttp://www.unjbg.edu.pe/institucion/historia.php>
14. Tinco-Salcedo J, Quispe-Gutiérrez U, Zea-Gonzales D, Tinco-Salcedo J, Quispe-Gutiérrez U, Zea-Gonzales D. Asociación entre calidad de ovocitos recuperados y condición corporal en vacas criollas. Rev Investig Altoandinas [Internet]. 2021 Aug 30 [cited 2022 Oct 23];23(3):133–8. Available from:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2313-29572021000300133&lng=es&nrm=iso&tlng=es

15. Martínez M, Celentano L. Efecto del Pre-Tratamiento con Somatotropina recombinante Bovina (rsST) en la Respuesta Superovulatoria de Donantes Holando Uruguayas a Nivel Comercial. Universidad de la República; 2008.
16. Limache Coaquera T. Efecto de la Adición de Fluido Folicular al Medio de Maduración de ovocitos para la Producción In Vitro de Embriones de Bovinos (Bos Taurus). 2015;131. Available from:
<http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/1073%0Ahttp://www.unjbg.edu.pe/institucion/historia.php>
17. Gallegos de la Hoya M. Fertilización In Vitro de Ovocitos Bovinos [Internet]. Universidad Autónoma de Nuevo León; 1998. Available from:
<http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080110336.PDF>
18. Blondin P, Sirard M -A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 1995;41(1):54–62.
19. Ancco Gomez E. Efecto de la motilidad espermática en la producción de embriones in vitro en bovinos. Univ Nac Agrar La Molina [Internet]. 2017 [cited 2023 Mar 12]; Available from: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/2898>
20. Abdoon ASS, Abdel-Rahman HA, Shawki SM, Kandil OM, Fathalla SI. Influence of follicle size, methods of retrieval on oocytes yield and morphology in Egyptian Jennies ovaries with special reference to maturation rate in vitro. *Vet Res Commun.* 2014;38(4):287–95.
21. Tinco-Salcedo J, Quispe-Gutiérrez U, Zea-Gonzales D, Tinco-Salcedo J, Quispe-Gutiérrez U, Zea-Gonzales D. Asociación entre calidad de ovocitos recuperados y condición corporal en vacas criollas. *Rev Investig Altoandinas* [Internet]. 2021 Aug 30 [cited 2022 Jul 23];23(3):133–8. Available from:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2313-29572021000300133&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
22. Sarwar Z, Sagheer M, Sosa F, Saad M, Hassan M, Husnain A, et al. Meta-analysis to

- determine effects of treatment with FSH when there is progestin-priming on in-vitro embryo production using ovum pick-up in *Bos taurus* cows. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2020;221(June):106590. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106590>
23. Leibfried L, First N. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci*. 1979;48(1):76–86.
 24. Gonella D ÁM, Atuesta Bustos JE, Bernal Ulloa SM, Chacón Jaramillo L. Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *RIAA*, ISSN-e 2145-6453, Vol 4, N° 1, 2013, págs 65-80 [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 20];4(1):65–80. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6285691&info=resumen&idioma=SPA>
 25. Quintana M, Campos P, Herrera P, Gallego C, Padrón E. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización in vitro FIV obtenidos de hembras *Bubalus Bubalis* enviadas a matadero. *Rev Salud Anim* [Internet]. 2012 [cited 2021 Oct 12];34(1):53–6. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2012000100008
 26. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio P. Metodología de la Investigación. Mc Graw Hill, editor. Mexico: 2014; 2014. 1–634 p.
 27. Valderrama Mendoza S. Pasos Para Elaborar Proyectos de Investigación Científica [Internet]. [cited 2021 Jun 17]. Available from: <https://idoc.pub/documents/pasos-para-elaborar-proyectos-de-investigacion-cientifica-santiago-valderrama-mendoza-d49oxekov249>
 28. Landínez J, Villamediana P, Hernández H, Soto E. Efecto del tiempo de maduración in vitro de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. 2010;XX:659–64.
 29. Vásquez N, Gómez J, Álvarez J, Chavarría N. Comparación de dos métodos de incubación sobre la maduración in vitro de oocitos bovinos. *Rev Politécnica* [Internet]. 2009;5(8):26–32. Available from:

<https://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/121>

ANEXOS

ANEXO 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA DEL PROYECTO DE TESIS:

Título: MADURACION IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS A DIFERENTES TIEMPOS Y COLECTADOS DE FOLICULOS DE DIFERENTE TAMAÑO EN CONDICIONES DE SIERRA – 2021

| FORMULACIÓN DEL PROBLEMA | OBJETIVOS | HIPOTESIS | TIPO, NIVEL Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN | VARIABLES | DISEÑO METODOLOGICO |
|---|--|--|--|---|--|
| <p>PROBLEMA GENERAL</p> <p>¿Cuál será la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovino a diferentes tiempos y colectados de folículos de diferente tamaño en condiciones de Sierra-2021?</p> | <p>OBJETIVO GENERAL</p> <p>Determinar la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovino a diferentes tiempos y colectados de folículos de diferente tamaño en condiciones de Sierra-2021</p> | <p>HIPOTESIS GENERAL H1</p> <p>La maduración in vitro de ovocitos bovinos a diferentes tiempos y colectados de folículos de diferente tamaño presentan diferencias en su capacidad de desarrollo en condiciones de Sierra-2021</p> <p>Ho</p> <p>La maduración in vitro de ovocitos bovinos a diferentes tiempos y colectados de diferente tamaño no presentan diferencias</p> | <p>TIPO DE INVESTIGACIÓN Aplicada-cuantitativa</p> <p>NIVEL DE INVESTIGACIÓN Explicativo</p> <p>DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Cusi-experimental</p> | <p>a. VARIABLES</p> <ul style="list-style-type: none"> - Variable de estudio: Tiempo de Maduración a 18, 20, 22, 24 Horas - Variable caracterizada: Tamaño de folículos de 2-4mm y 5-8mm Técnica de slicing y aspiración - Variables dependientes: Cantidad de ovocitos totales Cantidad de ovocitos viables (A y B) Cantidad de ovocitos no viables (C y D) Cantidad de ovocitos madurados | <p>POBLACION Ovarios y ovocitos</p> <p>TÉCNICAS INSTRUMENTOS La técnica será la observación y para la recolección de datos se utilizarán registros previamente elaborados para cada variable en campo y laboratorio.</p> <p>ANÁLISIS DE DATOS Para la variable cantidad de ovocitos madurados DCA con arreglo factorial 4X2X2, para la variable ovocitos totales se ha utilizado un diseño completamente al azar y para las variables de calidad de ovocitos se ha utilizado un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2x2</p> |

| | | | | | |
|---|---|--|--|--|--|
| <p>PROBLEMAS ESPECÍFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuál será la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos a diferentes tiempos en condiciones de Sierra-2021? • ¿Cuál será la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos colectados de folículos de 2 a 4 mm y 5 a 8 mm de diámetro en condiciones de Sierra-2021? • ¿Cuál será la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos recolectados mediante dos técnicas diferentes? | <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos a diferentes tiempos en condiciones de Sierra-2021 • Determinar la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos colectados de folículos de 2 a 4 mm y 5 a 8 mm de diámetro en condiciones de Sierra-2021 • Determinar la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos colectados mediante dos técnicas | <p>en su capacidad de desarrollo en condiciones de Sierra-2021</p> <p>HIPOTESIS ESPECIFICAS</p> <p>Hi: Los tiempos de maduración in vitro tienen efecto sobre la cantidad de ovocitos bovinos madurados en condiciones de Sierra - 2021</p> <p>Ho: Los tiempos de maduración in vitro no tienen efecto sobre la cantidad de ovocitos bovinos madurados en condiciones de Sierra - 2021</p> <p>Hi: El diámetro folicular de 2-4mm y 5-8 mm tiene efecto sobre la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos en condiciones de Sierra – 2021</p> <p>Ho: El diámetro folicular de 2-4mm y 4-8 mm no tienen efecto sobre la capacidad de maduración in vitro de ovocitos bovinos maduros en condiciones de Sierra – 2021</p> <p>Hi: Hay un efecto de la técnica de obtención de ovocitos bovinos sobre la capacidad de maduración in vitro en condiciones de Sierra-2021</p> <p>Ho: No hay un efecto de la técnica de obtención de ovocitos bovinos sobre la capacidad de maduración in vitro en condiciones de Sierra-2021</p> | | | |
|---|---|--|--|--|--|

ANEXO 2: OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

| Variables | Tipo de variable | Definición conceptual | Dimensión | Indicador | Instrumento | Escala |
|---|-------------------------|---|------------------|----------------------------|--------------------|---------------|
| Tasa de maduración in vitro de ovocitos por 18 horas | Cuantitativa discreta | La tasa de maduración se define como el total de ovocitos madurados presentes sobre el número de ovocitos recuperados por sesión multiplicado por 100 | 0 a 100 % | Porcentual Sesión x 100 | Calculadora | Numeral |
| Tasa de maduración in vitro de ovocitos por 20 horas | Cuantitativa discreta | La tasa de maduración se define como el total de ovocitos madurados presentes sobre el número de ovocitos recuperados por sesión multiplicado por 100 | 0 a 100 % | Porcentual Sesión x 100 | Calculadora | Numeral |
| Tasa de maduración in vitro de ovocitos por 22 horas | Cuantitativa discreta | La tasa de maduración se define como el total de ovocitos madurados presentes sobre el número de ovocitos recuperados por sesión multiplicado por 100 | 0 a 100 % | Porcentual Sesión x 100 | Calculadora | Numeral |
| Tasa de maduración in vitro de | Cuantitativa discreta | La tasa de maduración se define como el total de ovocitos madurados | 0 a 100 % | Porcentual Sesión x 100 | Calculadora | Numeral |

| | | | | | | |
|---|-----------------------|--|----------|-------------|-------------|---------|
| ovocitos por 24 horas | | presentes sobre el número de ovocitos recuperados por sesión multiplicado por 100 | | | | |
| Maduración de folículos de 2-4mm | Cualitativa continua | Estructuras del ovario que tienen como componente líquido folicular para su crecimiento y maduración | 2 a 4 mm | milímetros. | Ecógrafo | Numeral |
| Maduración de folículos de 5 a 8 mm | Cualitativa continua | Estructuras del ovario que tienen como componente líquido folicular para su crecimiento y maduración | 4 a 8 mm | milímetros. | Ecógrafo | Numeral |
| Tasa de recuperación de ovocitos por técnica slicing | Cuantitativa continua | Técnica que se ejecuta al cortar el ovario con un bisturí y permitiendo la salida de los ovocitos | % | porcentual | Calculadora | Numeral |
| Tasa de recuperación de ovocitos por técnica de aspiración | Cuantitativa continua | Técnica que se ejecuta al ingresar la aguja y absorber los folículos | % | porcentual | Calculadora | Numeral |

Anexo 3: FICHA DE RECOLECCIÓN

FICHA DE FILIACIÓN DE LABORATORIO – MADURACIÓN DE OVOCITOS

| FORMATO DE COLECTA DE OVOCITOS | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|--|
| TECNICA | | | | | | | | | | |
| TECNICA | OVARIOS | Nº Fol. 2-4 mm | Nº Fol. 4-8 mm | Nº ovocitos colectados | Nº ovocitos Viables A | Nº ovocitos Viables B | Nº ovocitos Inviabiles C | Nº ovocitos Inviabiles D | Tiempo de maduración 2-4 (18 H) | Tiempo de maduración 5-8 (18 H) |
| ASPIRACION | 14 | 16 | | 16 | 10 | 5 | 0 | 1 | ASPIRACION: A: 10 B: 5 | |
| | | | 47 | 47 | 9 | 10 | 10 | 8 | | ASPIRACION: A: 9 B: 8 |
| SLICING | 13 | 30 | | 30 | 10 | 10 | 5 | 5 | SLICING: A:10 B:10 | |
| | | | 45 | 45 | 10 | 13 | 20 | 2 | | SLICING: A:9 B:10 |
| | | | | | | | | | Tiempo de maduración 2-4 (20 H) | Tiempo de maduración 5-8 (20 H) |
| ASPIRACION | 16 | 65 | | 65 | 14 | 23 | 27 | 1 | ASPIRACION: A: 12 B: 20 | |
| | | | 23 | 23 | 3 | 5 | 15 | 0 | | ASPIRACION: A: 3 B: 5 |
| SLICING | 14 | 18 | | 18 | 0 | 7 | 9 | 2 | SLICING: A:0 | |

| | | | | | | | | | | |
|------------|----|----|----|----|----|----|----|---|--|--|
| | | | | | | | | | B:7 | |
| | | | 20 | 20 | 3 | 9 | 6 | 2 | | SLICING: A:3 B:9 |
| | | | | | | | | | Tiempo de maduración 2-4 (22 H) | Tiempo de maduración 5-8 (22 H) |
| ASPIRACION | 25 | 16 | | 16 | 10 | 5 | 0 | 1 | ASPIRACION: A: 10 B: 5 | |
| | | | 25 | 25 | 10 | 13 | 1 | 1 | | ASPIRACION: A: 9 B: 12 |
| SLICING | 25 | 47 | | 47 | 10 | 10 | 20 | 7 | SLICING: A:10 B:10 | |
| | | | 45 | 45 | 10 | 13 | 20 | 2 | | SLICING: A:10 B:13 |
| | | | | | | | | | Tiempo de maduración 2-4 (24 H) | Tiempo de maduración 5-8 (24 H) |
| ASPIRACION | 22 | 57 | | 57 | 8 | 14 | 31 | 4 | ASPIRACION: A: 8 B: 14 | |
| | | | 58 | 58 | 11 | 14 | 31 | 1 | | ASPIRACION: A: 11 B: 10 |

| | | | | | | | | | | |
|------------|----|----|----|----|----|----|----|---|--|--|
| SLICING | 22 | 32 | | 32 | 5 | 14 | 12 | 1 | SLICING: A:5 B:12 | |
| | | | 16 | 16 | 0 | 8 | 6 | 2 | | SLICING: A:0 B:7 |
| | | | | | | | | | Tiempo de maduración 2-4 (18 H) | Tiempo de maduración 5-8 (18 H) |
| ASPIRACION | 10 | 20 | | 20 | 9 | 7 | 7 | 0 | ASPIRACION: A: 6 B: 5 | |
| | | | 29 | 29 | 13 | 9 | 6 | 1 | | ASPIRACION: A: 5 B: 7 |
| SLICING | 10 | 27 | | 27 | 9 | 8 | 8 | 2 | SLICING: A:8 B:5 | |
| | | | 40 | 40 | 15 | 10 | 12 | 3 | | SLICING: A:11 B: 8 |
| | | | | | | | | | Tiempo de maduración 2-4 (20 H) | Tiempo de maduración 5-8 (20 H) |
| ASPIRACION | 12 | 25 | | 25 | 7 | 8 | 9 | 1 | ASPIRACION: A: 5 B: 5 | |

| | | | | | | | | | | |
|------------|----|----|----|----|----|----|----|---|--|--|
| | | | 18 | 18 | 9 | 7 | 1 | 1 | | ASPIRACION: A: 6 B: 5 |
| SLICING | 12 | 45 | | 45 | 12 | 15 | 15 | 3 | SLICING: A:8 B:10 | |
| | | | 35 | 35 | 13 | 7 | 15 | 0 | | SLICING: A:11 B:5 |
| | | | | | | | | | Tiempo de maduración 2-4 (22 H) | Tiempo de maduración 5-8 (22 H) |
| ASPIRACION | 18 | 19 | | 19 | 8 | 6 | 5 | 0 | ASPIRACION: A: 8 B: 5 | |
| | | | 31 | 31 | 12 | 10 | 9 | 0 | | ASPIRACION: A: 11 B: 10 |
| SLICING | 18 | 52 | | 52 | 13 | 15 | 22 | 2 | SLICING: A:13 B:15 | |
| | | | 35 | 35 | 11 | 9 | 14 | 1 | | SLICING: A:10 B:8 |
| | | | | | | | | | Tiempo de maduración 2-4 (24 H) | Tiempo de maduración 5-8 (24 H) |
| ASPIRACION | 10 | 21 | | 21 | 7 | 8 | 5 | 1 | ASPIRACION: A: 7 B: 8 | |

| | | | | | | | | | | |
|---------|----|----|----|----|---|----|---|---|--------------------------|-----------------------------|
| | | | 10 | 10 | 3 | 5 | 2 | 0 | | ASPIRACION: A: 2 B: 4 |
| SLICING | 10 | 30 | | 30 | 9 | 16 | 4 | 1 | SLICING: A: 9 B:14 | |
| | | | 25 | 25 | 6 | 8 | 8 | 3 | | SLICING: A:6 B:8 |

ANEXO 4:

DECLARACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD

Yo Contreras Jerónimo Yosilin Lisbeth identificado (a) con DNI N° 70094269 egresado la escuela profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia (vengo/habiendo) implementando/implementado el proyecto de investigación titulado “**MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS A DIFERENTES TIEMPOS Y COLECTADOS DE FOLÍCULOS DE DIFERENTE TAMAÑO EN CONDICIONES DE SIERRA - 2021**”, en ese contexto declaro bajo juramento que los datos que se generen como producto de la investigación, así como la identidad de los participantes serán preservados y serán usados únicamente con fines de investigación de acuerdo a lo especificado en los artículos 27 y 28 del Reglamento General 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 de alguno de ellos.

Huancayo, 28 de febrero 2023.



CONTRERAS JERONIMO YOSILIN LISBETH

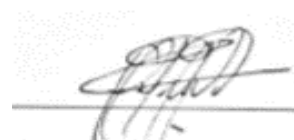
Responsable de investigación

ANEXO 5:

COMPROMISO DE AUTORIA

En la fecha, yo Contreras Jerónimo Yosilin, identificado con DNI N° 70094269, Domiciliado en Av. Real N°140- Huancayo-Junín, estudiante de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Los Andes, me **COMPROMETO** a asumir las consecuencias administrativas y/o penales que hubiera lugar si en la elaboración de mi investigación titulada **“MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS A DIFERENTES TIEMPOS Y COLECTADOS DE FOLÍCULOS DE DIFERENTE TAMAÑO EN CONDICIONES DE SIERRA - 2021”** se haya considerado datos falsos, falsificación, plagio, auto plagio, etc. y declaro bajo juramento que el trabajo de investigación es de mi autoría y los datos presentados son reales y he respetado las normas internacionales de citas y referencias de las fuentes consultadas.

Huancayo, 28 de febrero 2023



Contreras Jerónimo Yosilin Lisbeth

ANEXO 6: ANALISIS ESTADISTICOS

Análisis de varianza y prueba de DLS para la variable técnica y diámetro en ovocitos no viables

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados Medios | Fc | Pr > F |
|------------------------|--------------------|-------------------|------------------|------|--------|
| Model | 3 | 1110.687500 | 370.229167 | 6.39 | 0.0078 |
| Error | 12 | 695.250000 | 57.937500 | | |
| Corrected Total | 15 | 1805.937500 | | | |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|------------|-------------|-------------|------------|--------|
| t | 1 | 280.5625000 | 280.5625000 | 4.84 | 0.0481 |
| d | 1 | 770.0625000 | 770.0625000 | 13.29 | 0.0034 |
| t*d | 1 | 60.0625000 | 60.0625000 | 1.04 | 0.3287 |
| | | | | | |
| Level of t | Level of d | N | on | | |
| | | | Mean | Std Dev | |
| Aspiraci | I | 4 | 8.2500000 | 8.61684397 | |
| Aspiraci | II | 4 | 18.2500000 | 6.99404509 | |
| Slicing | I | 4 | 12.7500000 | 9.10585892 | |
| Slicing | II | 4 | 30.5000000 | 5.06622805 | |

ANEXO 7: Análisis de varianza y prueba de DLS para la variable técnica y diámetro en ovocitos viables

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados Medios | Fc | Pr > F |
|------------------------|--------------------|-------------------|------------------|------|--------|
| Model | 3 | 423.6875000 | 141.2291667 | 3.03 | 0.0709 |
| Error | 12 | 558.7500000 | 46.5625000 | | |
| Corrected Total | 15 | 982.4375000 | | | |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|------------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| t | 1 | 85.5625000 | 85.5625000 | 1.84 | 0.2002 |
| d | 1 | 333.0625000 | 333.0625000 | 7.15 | 0.0202 |
| t*d | 1 | 5.0625000 | 5.0625000 | 0.11 | 0.7473 |

| Level of t | Level of d | N | ov | |
|------------|------------|---|------|---------|
| | | | Mean | Std Dev |

| | | | | |
|-----------------|-----------|----------|------------|------------|
| Aspiraci | I | 4 | 29.2500000 | 6.44851404 |
| Aspiraci | II | 4 | 19.0000000 | 7.61577311 |
| Slicing | I | 4 | 23.5000000 | 6.40312424 |
| Slicing | II | 4 | 15.5000000 | 6.75771164 |

ANEXO 8: Análisis de varianza y prueba de DLS para efecto de la técnica de obtención de ovocitos sobre la cantidad de ovocitos totales

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados Medios | Fc | Pr > F |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------|------------------|
| Model | 1 | 855.562500 | 855.562500 | 3.07 | 0.1015 |
| Error | 14 | 3898.875000 | 278.491071 | | |
| Corrected Total | 15 | 4754.437500 | | | |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|---------------|-----------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| tto | 1 | 855.5625000 | 855.5625000 | 3.07 | 0.1015 |

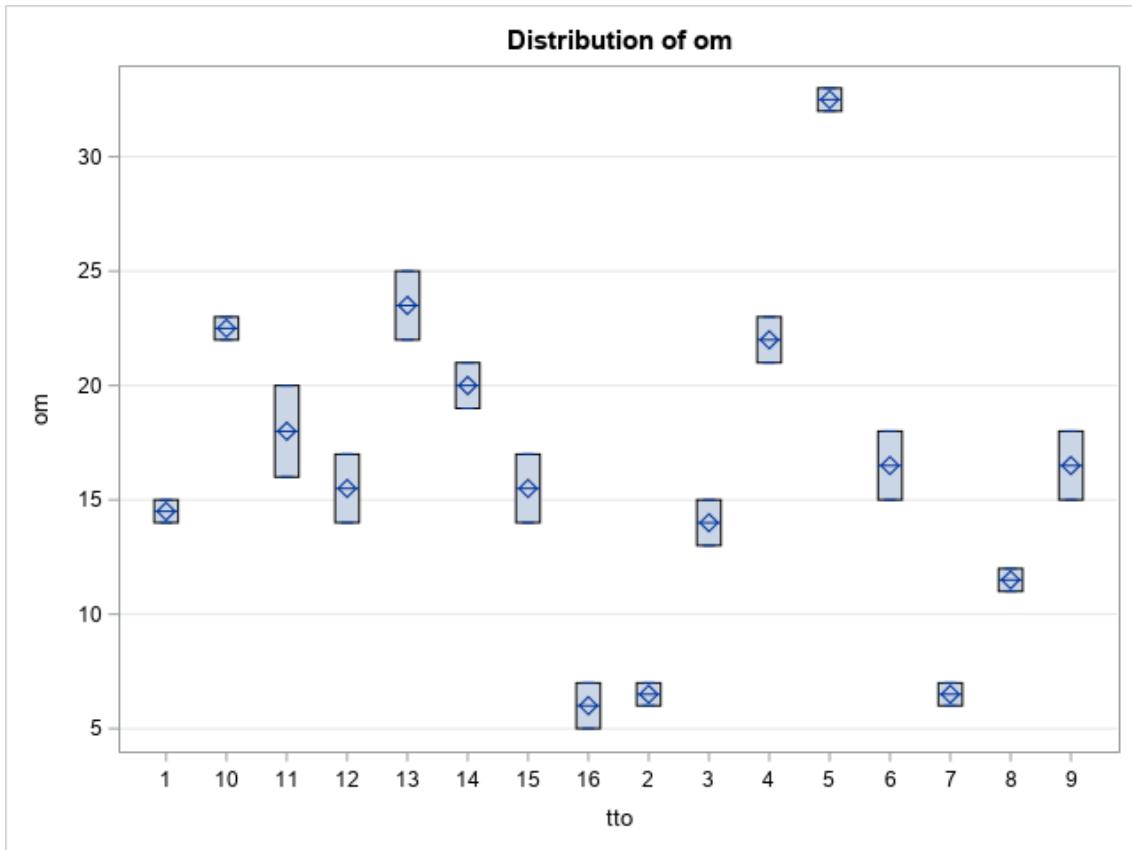
ANEXO 9: Análisis de varianza y prueba de DLS para efecto de triple interacción de técnica, diámetro y horas de maduración.

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados Medios | Fc | Pr > F |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------|------------------|
| Model | 15 | 1465.718750 | 97.714583 | 37.67 | <.0001 |
| Error | 16 | 41.500000 | 2.593750 | | |
| Corrected Total | 31 | 1507.218750 | | | |

| Source | DF | Type I SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|---------------|-----------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| h | 3 | 61.843750 | 20.614583 | 7.95 | 0.0018 |
| t | 1 | 236.531250 | 236.531250 | 91.19 | <.0001 |
| d | 1 | 52.531250 | 52.531250 | 20.25 | 0.0004 |
| h*t*d | 10 | 1114.812500 | 111.481250 | 42.98 | <.0001 |

| Level of h | Level of t | Level of d | N | om | |
|-------------------|-------------------|-------------------|----------|-------------|----------------|
| | | | | Mean | Std Dev |
| A | Aspiraci | I | 2 | 14.5000000 | 0.70710678 |

| | | | | | |
|---|----------|----|---|------------|------------|
| A | Aspiraci | II | 2 | 6.5000000 | 0.70710678 |
| A | Slicing | I | 2 | 14.0000000 | 1.41421356 |
| A | Slicing | II | 2 | 22.0000000 | 1.41421356 |
| B | Aspiraci | I | 2 | 32.5000000 | 0.70710678 |
| B | Aspiraci | II | 2 | 16.5000000 | 2.12132034 |
| B | Slicing | I | 2 | 6.5000000 | 0.70710678 |
| B | Slicing | II | 2 | 11.5000000 | 0.70710678 |
| C | Aspiraci | I | 2 | 16.5000000 | 2.12132034 |
| C | Aspiraci | II | 2 | 22.5000000 | 0.70710678 |
| C | Slicing | I | 2 | 18.0000000 | 2.82842712 |
| C | Slicing | II | 2 | 15.5000000 | 2.12132034 |
| D | Aspiraci | I | 2 | 23.5000000 | 2.12132034 |
| D | Aspiraci | II | 2 | 20.0000000 | 1.41421356 |
| D | Slicing | I | 2 | 15.5000000 | 2.12132034 |
| D | Slicing | II | 2 | 6.0000000 | 1.41421356 |



Anexo 10: Evidencias fotográficas



Figura 06: Desarrollo y ejecución de la tesis en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional del Centro del Perú



Figura 07: Recepción de los ovarios que fueron traídos del matadero a T° 38.5 con Suero Fisiológico + Antibiótico 0.5ml para colocarlo en la platina temperada a T° 38.5



Figura 08: Técnica de Aspiración con jeringa de 5 ml y aguja N° 18 x 1 1/2



Figura 09: Técnica de Slicing, se realiza con cortes transversales y sagitales, para aspirarlo con ayuda de la pipeta Pasteur y colocarlos en tubos Falcon para su sedimentación



Figura 10: Después de la sedimentación, se elimina el sobrenadante, se repite el procedimiento tres veces, hasta que esté más claro, tomar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y colocarlo en una placa Petri para la búsqueda de los ovocitos.

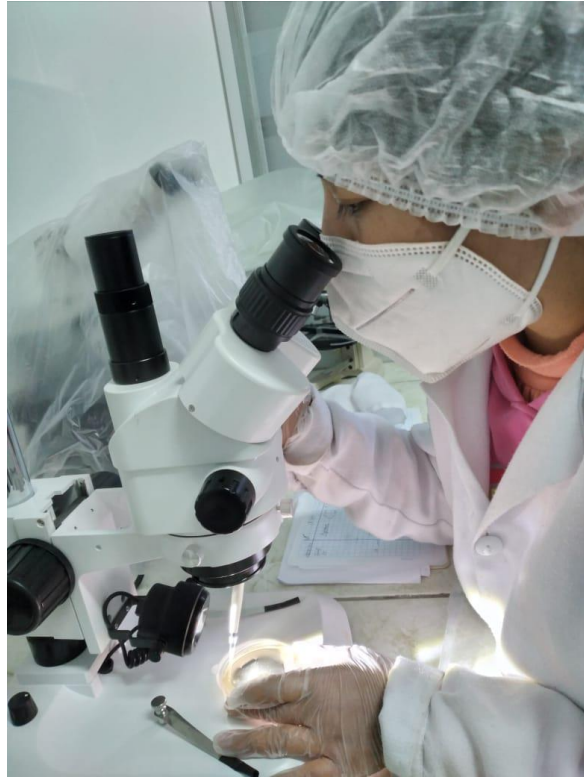


Figura 11: Búsqueda de los ovocitos categoría A, B, C Y D



Figura 12: Ubicación de los ovocitos



Figura 13: Los ovocitos que se encontraron se colocaron en una placa Petri con suero fisiológico, nos ayudamos con la platina para mantener la temperatura

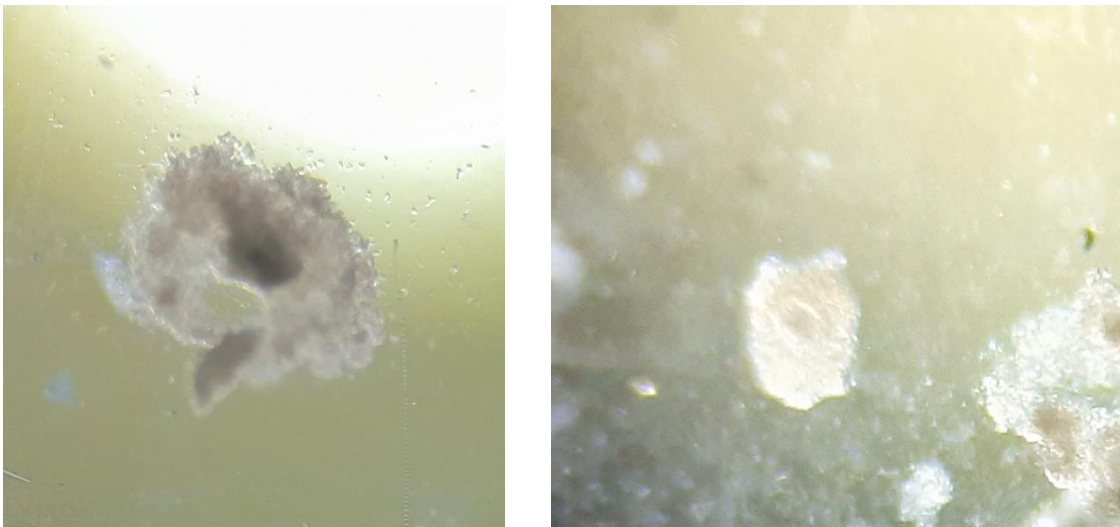


Figura 14: Se realiza la clasificación de A y B que son los ideales para la maduración



Figura 15: Colocación de categoría A y B en las placas especiales para maduración in vitro



Figura 16: Preparación del Medio Heces para el lavado de los ovocitos, consiste en 8 gotas de 35 ul.



Figura 17: Colecta de 10 ovocitos, para poderlo lavar en las gotas del medio Hepes

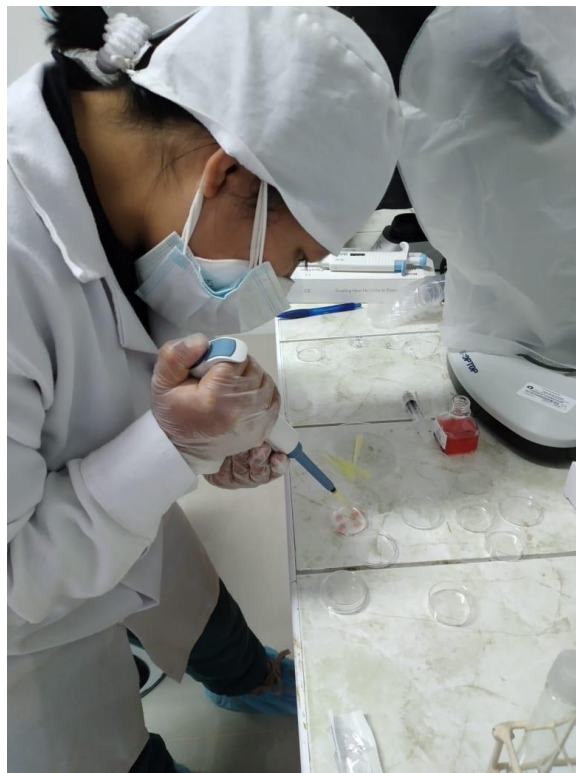


Figura 18: Lavado con el medio de Maduración



Figura 19: Preparación del Medio de Maduración con 4 gotas de 70ml, después el colocado del aceite mineral, para llevarlo a la incubadora

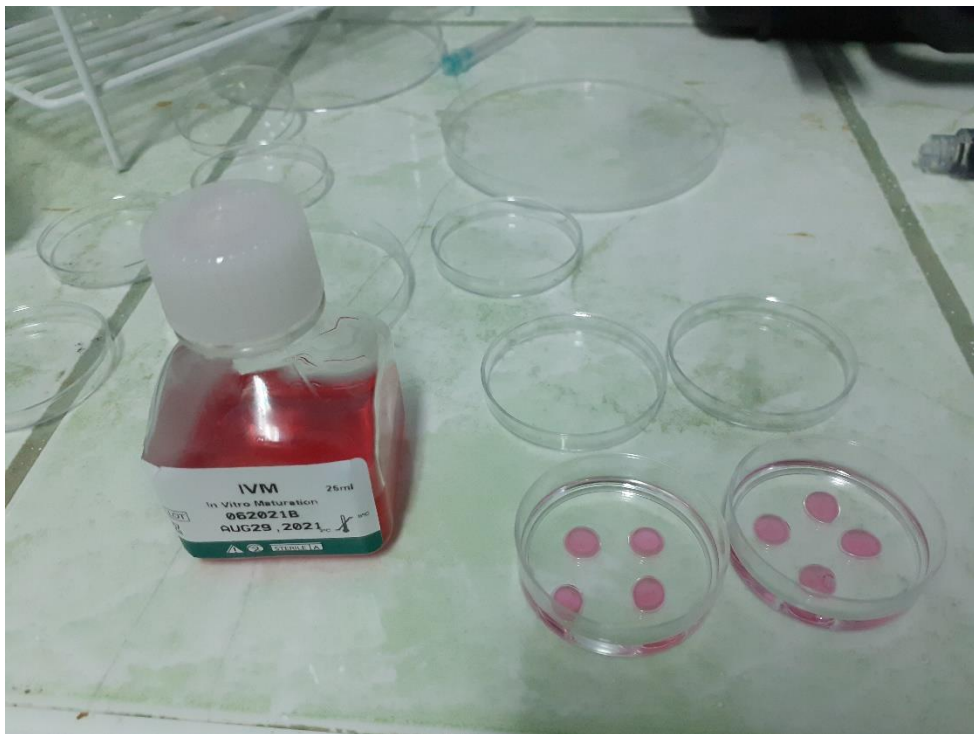


Figura 20: Medio de maduración listo para la incubación



Figura 21: Llevar la placa con el medio de maduración, en cada gota se colocaron 10 ovocitos, estos serán llevados a la incubadora por 18,20,22, y 24 horas para su posterior evaluación.



Figura 22: Colocado de las muestras para su maduración



Figura 23: Incubando las muestras

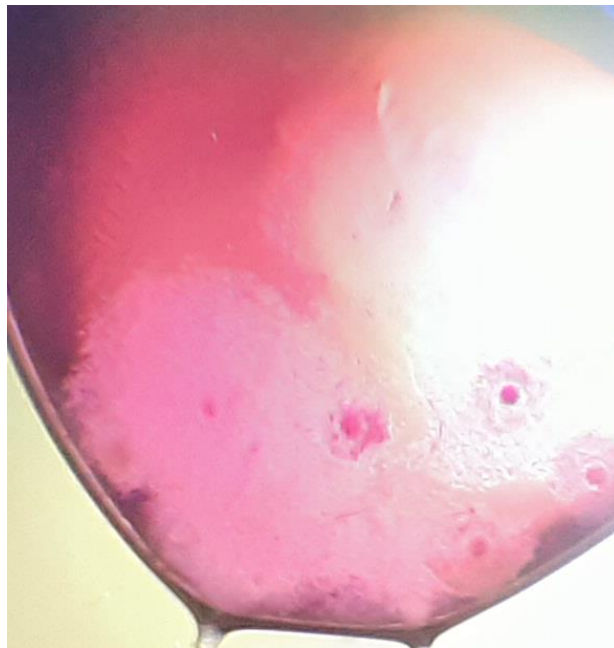


Figura 24: Ovocitos madurados a 22 horas de incubación, se observa la expansión de los cumulus ofuroos. Categoría A

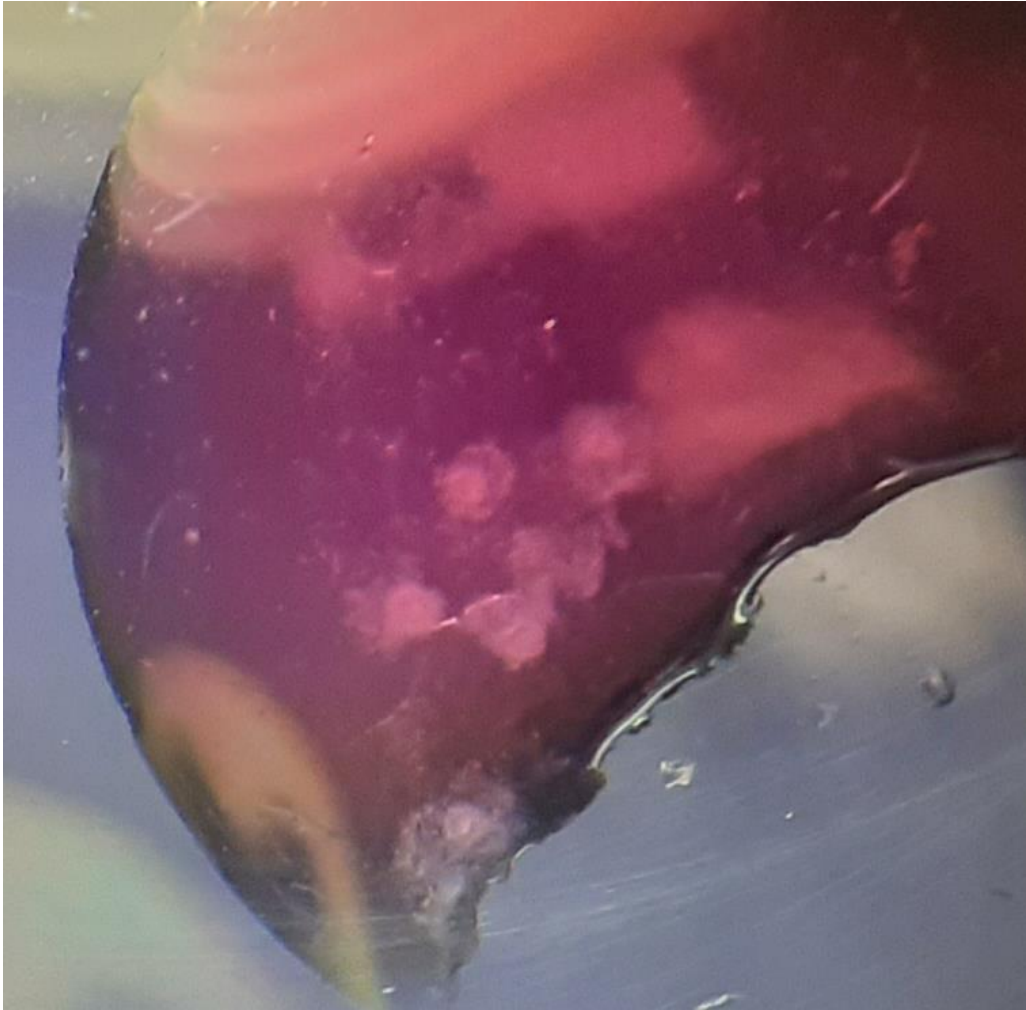


Figura 25: Ovocitos madurados a 20 horas, categoría B

