

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

Diferentes concentraciones de hCG en la maduración *In vitro* de ovocitos recuperados de diferentes tamaños foliculares en vacas criollas

Presentada por:

Juan Liner Escobedo Zarate

Para optar el Título Profesional de
Médico Veterinario y Zootecnista

Abancay, Perú

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

“DIFERENTES CONCENTRACIONES DE hCG EN LA MADURACIÓN *In vitro* DE
OVOCITOS RECUPERADOS DE DIFERENTES TAMAÑOS FOLICULARES EN
VACAS CRIOLLAS”

Presentado por **Juan Liner Escobedo Zarate**, para optar el Título de:
Médico Veterinario y Zootecnista

Sustentado y aprobado el 1 de diciembre de 2022 ante el Jurado Evaluador:

Presidente:



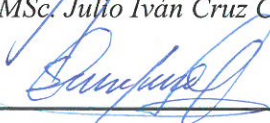
MSc. Ludwing Angel Cárdenas Villanueva

Primer Miembro:




MSc. Julio Iván Cruz Colque

Segundo Miembro:

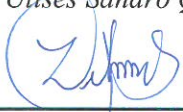


M.V.Z. Juan Roberto Soncco Quispe

Asesor (es):



Dr. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez



MSc. Delmer Zea Gonzales

Agradecimiento

Agradecer A la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac (UNAMBA), por darme la oportunidad de formar parte de ella.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAMBA por mostrarme los conocimientos y formación académica.

Al Dr. Ulises Sandro Quispe Gutierrez Asesor de esta tesis por su apoyo, comprensión y tiempo brindado en el desarrollo del presente estudio.

Agradecimiento al MSc. Delmer Zea Gonzales Coasesor de esta tesis por el asesoramiento por sus consejos, exigencias y sus críticas.

Agradecimiento al MSc. Isai Ochoa Pumaylle por el apoyo brindado en el asesoramiento, consejos y críticas para la elaboración de este estudio.

Agradecimiento al MVZ. Jose Daniel Gonzales Castillo por el apoyo y orientación que brindo en mi formación profesional.

Agradecimiento al MVZ Ccopa Ccallata Jhunion por el apoyo y la incentivación a la investigación veterinaria que me brindo en mi formación profesional.

A mis apreciados docentes por inculcarme valores y responsabilidad en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



Dedicatoria

A mis padres Elena Zarate Vera y Juan Benito Escobedo Cusi por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre por estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio, agotadoras noches en las que su compañía y la llegada de sus cafés era para mí como agua en el desierto; gracias a mi padre por siempre desear y anhelar siempre lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida.

A mi hermana Yudith Elena Escobedo Zarate y familiares por su cariño y apoyo.

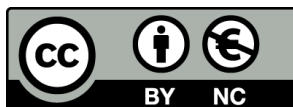
A Fiorela Utani Bovadilla, por el aprecio, apoyo y pasión que me brinda en el día a día, con la que describo el perfecto e incondicional apoyo fue el mismo con el que desarrollé cada parte y punto de esta tesis, y por esto mismo puedo afirmar y pronosticar su éxito y agrado para cada uno de sus lectores.



“Diferentes concentraciones de hCG en la maduración *In vitro* de ovocitos recuperados de diferentes tamaños foliculares en vacas criollas”

Línea de investigación: Ciencias Veterinarias

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons



ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
CAPÍTULO I	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.1 Descripción del problema	5
1.2 Enunciado del problema	6
1.2.1 Problema general	6
1.2.2 Problemas específicos	6
1.2.3 Justificación de la investigación	6
CAPÍTULO II	8
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	8
2.1 Objetivos de la investigación	8
2.2.1 Objetivo general	8
2.2.2 Objetivos específicos	8
2.2 Hipótesis de la investigación	8
2.2.3 Hipótesis general	8
2.2.4 Hipótesis específicas	8
2.3 Operacionalización de variables	9
CAPÍTULO III	10
MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	10
3.1 Antecedentes	10
3.2 Marco teórico	12
3.2.1 Importancia del bovino criollo peruano	12
3.2.2 Fisiología reproductiva de la hembra bovina	13
3.2.3 Ovarios	13
3.2.4 Ciclo estral bovino y su influencia en los ovocitos	13
3.2.5 Factores que afectan la producción y calidad de los ovocitos	14
3.2.5.1 Técnica de aspiración de ovocitos	14
3.2.5.2 Aptitud productiva	14
3.2.5.3 Fase del ciclo estral	14
3.2.5.4 Peso de los ovarios	15
3.2.5.5 Edad de la donante	15
3.2.5.6 Condición corporal	15
3.2.6 Escalas de evaluación de la condición corporal	15
3.2.7 Crecimiento folicular y ovulación	16

3.2.8	Foliculogénesis.....	16
3.2.9	Clasificación de los folículos	17
3.2.9.1	Folículo primordial	17
3.2.9.2	Folículo primario	17
3.2.9.3	Folículo secundario	17
3.2.9.4	Folículo antral.....	18
3.2.10	Ovogenesis	18
3.2.11	Ovocito.....	18
3.2.11.1	Ovocito primario	18
3.2.11.2	Ovocito secundario.....	18
3.2.12	Maduración de ovocitos	19
3.2.13	Maduración nuclear y citoplasmática del ovocito.....	19
3.2.14	Método de obtención de ovocitos.....	21
3.2.14.1	Aspiración folicular	21
3.2.14.2	Slicing.....	21
3.2.14.3	Aspiración transvaginal ecoguiada (OPU).....	21
3.2.15	Evaluación de ovocitos para maduración <i>in vitro</i>	21
3.2.16	Características de un ovocito maduro	23
3.2.17	Parámetros de evaluación de un ovocito maduro.....	23
3.2.18	Gonadotropina coriónica humana (hCG).....	24
3.2.19	Medio de maduración.....	26
3.3	Marco conceptual.....	26
CAPÍTULO IV.....		28
METODOLOGÍA.....		28
4.1	Tipo y nivel de investigación.....	28
4.2	Diseño de la investigación	28
4.3	Población y muestra.....	29
4.4	Técnicas e instrumentos / procedimiento de la investigación.....	29
4.4.1	Localización	29
4.4.2	Colección de ovarios y transporte	29
4.4.3	Recuperación y evaluación de ovocitos	29
4.4.4	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.....	30
4.4.5	Evaluación morfológica del ovocito	30
4.5	Análisis estadístico	31
CAPÍTULO V		32
RESULTADOS Y DISCUSIONES		32
5.1	Análisis de resultados	32
5.1.1	Ovocitos recuperados	32



5.1.2	Expansión del cumulo del ovocito suplementado con diferentes concentraciones de gonadotropina coriónica humana (hCG)	32
5.1.3	Expansión del cumulo de ovocito según tamaño folicular.....	33
5.2	Discusión	34
CAPÍTULO VI.....		36
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		36
6.1	Conclusiones.....	36
6.2	Recomendaciones	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		37
ANEXOS-		46



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Operacionalización de variables de estudio	9
Tabla 2. Criterios para la clasificación de ovocitos de acuerdo a las características morfológicas previa a la maduración (85)	22
Tabla 3. Distribución de los ovocitos de vacunos criollos según tratamiento con tamaño folicular y madurados con diferentes concentraciones de hCG.....	28
Tabla 4. Ovocitos (media \pm DE) recuperados según tamaño folicular de vacas criollas ($P \leq 0.05$)	32
Tabla 5. Promedio (media \pm DE) de grado de expansión del cúmulo de ovocitos con diferentes concentraciones de gonadotropina coriónica humana (hCG)	33
Tabla 6. Promedio (media \pm DE) de grado de expansión del cúmulo de ovocitos según tamaño folicular, ($P > 0.05$).	33
Tabla 7. Base de datos de la colección de ovocitos por medio de la técnica de aspiración folicular	47
Tabla 8. Prueba de Shapiro-Wilks para normalidad de datos de ovocitos recuperados.	48
Tabla 9. Pruebas de Levene para homogeneidad de varianza de ovocitos recuperados según tamaño folicular.	48
Tabla 10. Medidas estadísticas de resumen de la (Media \pm Desviación estándar) de ovocitos colectados.	49
Tabla 11. ANOVA para las diferentes categorías de ovocitos colectados según tamaño folicular.....	49
Tabla 12. Base de datos de la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos por expansión de los cúmulos.....	50
Tabla 13. Prueba de Shapiro-Wilks para normalidad datos de los grados de expansión del cúmulo.	51
Tabla 14. Prueba de Levene para homogeneidad de varianza de los grados de expansión del cúmulo.	51
Tabla 15. ANOVA para grados de maduración, según concentración, tamaño folicular e interacción.	52
Tabla 16. Medidas estadísticas de resumen de la (Media \pm Desviación estándar) de la concentración de hCG	52
Tabla 17. ANOVA y pruebas de comparación múltiple para la variable concentración hCG	53
Tabla 18. Medidas estadísticas de resumen de la (Media \pm Desviación estándar) de la variable tamaño folicular.....	54
Tabla 19. Datos de valores normales transformados a valores angulares para la prueba de homogeneidad.....	55



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Valoración de la expansión del cúmulo	23
Figura 2. Esterilización de materiales de laboratorio	55
Figura 3. Preparación de medios solución madre para MIV	56
Figura 4. Preparación de medio de maduración y paqueo.....	56
Figura 5. Obtención de ovarios en el centro de beneficio	56
Figura 6. Obtención de líquido folicular	57
Figura 7. Búsqueda de ovocitos	57
Figura 8. Categorización de ovocitos	58
Figura 9. Lavado y acostumbramiento al medio de maduración.....	58
Figura 10. Incubación en cámara de CO2	58
Figura 11. Evaluación post maduración	58
Figura 12. Clasificación de los ovocitos después de la maduración, según grado de maduración	59
Figura 13. Toma de los datos de maduración.....	59
Figura 14. Toma de datos de vacas criollas.....	60

INTRODUCCIÓN

El ganado bovino (*Bos taurus*) criollo es parte de la biodiversidad; en el Perú se encuentra mayormente en zonas alto andinas (1). Estos bovinos, en las comunidades campesinas cumplen roles importantes, como fuentes de proteína (carne, leche, queso) (2), seguridad alimentaria (3), en la región Apurímac se tiene vacunos caracterizados morfológica, morfoestructural y fanerópticamente, estos bovinos criollos, específicamente caracterizados tienen características o aptitudes con tendencia hacia la producción de leche, además de su rusticidad (4); de igual importancia, estos vacunos criollos cumplen los roles de la seguridad alimentaria en la población de Abancay a través de las carcasas obtenidas; por otra parte, se obtiene pieles que aporta una fuente económica, estos vacunos provenientes de diferentes lugares de la región de Apurímac, son traídas al camal municipal de Abancay para su respectivo proceso del beneficio (5); asimismo, los vacunos criollos aportan fuerza de trabajo, se adapta a diferentes ecosistemas, presenta alta variabilidad genética (6); además, es parte de su identidad cultural de los pobladores andinos, por lo que, es necesario mantener y preservar los bovinos criollos (7), implementando programas de conservación genética (8), *in situ* y *ex situ* (9).

En el Perú existen pocos programas de mejoramiento genético de ganado criollo, su implementación llevaría muchos años; frente a esta realidad, la producción *in vitro* de embriones es una tecnología alternativa que acortaría el tiempo utilizando genética deseada. Esta biotecnología tiene tres etapas; la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* de embriones (CIV) (10), uno de los programas a nivel regional se está proyectando un núcleo genético regional de ganado vacuno en Apurímac, que se busca aumentar la generación de embriones y crías de ganado con alta calidad de carne y leche, y para eso el ganado vacuno criollo van a ser necesarios como receptoras (11). La producción *in vitro* de embriones está en incremento ante la producción *in vivo* (12). La MIV es una técnica de reproducción asistida prometedora, ovocitos de folículos de diferente tamaño, inclusive menores de 4 mm tienen capacidad de fecundación (13, 14), Estos ovocitos se encuentran en el estadio de vesícula germinal, tras la maduración nuclear alcanzarán a metafase II (15), conseguir este estadio es crucial para la fertilización, división y desarrollo embrionario exitoso (16). Siendo un signo de maduración de ovocitos la expansión del cúmulo o musificación.

La MIV de los ovocitos bovinos está influenciada por muchos factores; como el tamaño folicular (17, 18). Los Componentes del medio de maduración (19) y hormonas (20), cabe resaltar además que la obtención de los ovarios provenientes de vacunos hembras beneficiadas en el camal es una fuente fundamental para la recuperación de COCs, haciendo más fácil la disponibilidad de ovocitos a bajo precio, los que serían madurados, fertilizados y cultivados in



vitro hasta estados avanzados del desarrollo embrionario (21). Pero también es una desventaja cuando los ovarios son adquiridos de diferentes condiciones ya sea del animal o la técnica de colección. Estudios previos sobre maduración *in vitro* de ovocitos, hacen referencia al uso de gonadotropinas, fundamentalmente la hormona luteinizante (LH) (22, 23), o su análoga la gonadotropina coriónica humana (hCG) (24). Los ovocitos recuperados de diferentes tamaños de folículos afectan la tasa de división embrionaria *in vitro* (25). La concentración de la hCG y el tamaño folicular podrían influir en la expansión del cúmulo en la maduración *in vitro* de ovocitos; sin embargo, todavía no está claro. Por las consideraciones mencionadas, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del tamaño folicular sometido a diferentes concentraciones de hCG sobre la expansión de cúmulos durante la maduración *in vitro* de ovocitos de vacas criollas.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos recuperados de diferentes tamaños foliculares y sometidos a medio de maduración a diferentes concentraciones de gonadotropina coriónica humana (hCG) en vacas criollas. Los ovarios fueron obtenidos de vacas criollas en el matadero. La recuperación de los ovocitos se realizó por aspiración folicular y se clasificó en categorías A, B y C (A y B se consideraron para maduración *in vitro*), luego se maduraron *in vitro* en medio TCM-199 suplementados con 0, 5 y 15 UI/mL de hCG, se agruparon según procedencia de folículos de ≤ 2 mm y $>2 - 8$ mm. La maduración de ovocitos se evaluó de acuerdo a grados de expansión del cúmulo del ovocito. Grado 1: poco o nada de expansión de cúmulo; Grado 2: expansión moderada de las capas del cúmulo; Grado 3: expansión de todas las capas del cúmulo. Como resultado el promedio de ovocitos recuperados por ovario entre los diferentes tamaños foliculares (≤ 2 mm y $>2-8$ mm) no presentó diferencia estadística ($P>0.05$), tampoco hubo diferencia para ovocitos viables por ovario ($P>0.05$). No se encontró interacción ($P>0.05$) entre tamaño folicular y concentración de hCG en la expansión del cúmulo de ovocitos. Se obtuvo mayor ($P\leq 0.05$) porcentaje de ovocitos con expansión con concentraciones de 5 o 15 versus 0 UI/mL de hCG. El tamaño folicular no influyó ($P>0.05$) en la expansión del cúmulo de ovocitos. Se concluye que el tamaño folicular no influye en el promedio de ovocitos recuperados por ovario y también para ovocitos viables para maduración *in vitro*; por un lado, la suplementación de hCG en medio de maduración, influyó en la expansión del cúmulo de ovocitos, más no el tamaño folicular, durante la maduración *in vitro* de ovocitos de vacas criollas.

Palabras clave: expansión del cúmulo; hCG; Oocito; vacas nativas.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the *in vitro* maturation of recovered oocytes of different follicular sizes and subjected to maturation medium at different concentrations of human chorionic gonadotropin (hCG) in creole cows. The ovaries were obtained from Creole cows with low body conditions at the slaughterhouse. Oocyte retrieval was performed by follicular aspiration and classified into categories A, B and C (A and B were considered for *in vitro* maturation), then they were matured *in vitro* in TCM-199 medium supplemented with 0, 5 and 15 IU /mL of hCG, were grouped according to origin of follicles ≤ 2 mm and $> 2 - 8$ mm. Oocyte maturation was evaluated according to degrees of expansion of the oocyte cumulus. Grade 1: Little or no cluster expansion; Grade 2: moderate expansion of the cumulus layers; Grade 3: expansion of all the layers of the cumulus. As a result, the average number of oocytes retrieved per ovary between the different follicular sizes (≤ 2 mm and $>2-8$ mm) did not present a statistical difference ($P>0.05$), nor was there a difference for viable oocytes per ovary ($P>0.05$). No interaction was found ($P>0.05$) between follicular size and hCG concentration in oocyte cluster expansion. A higher ($P\leq 0.05$) percentage of oocytes with expansion was obtained with concentrations of 5 or 15 versus 0 IU/mL of hCG. Follicular size did not influence ($P>0.05$) the expansion of the oocyte pool. It is concluded that follicular size does not influence the average number of oocytes retrieved per ovary and also for viable oocytes for *in vitro* maturation; On the one hand, the supplementation of hCG in the maturation medium influenced the expansion of the oocyte cluster, but not the follicular size, during the *in vitro* maturation of oocytes from creole cows

Keywords: *Cluster expansion; hCG; oocyte; native cows.*

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

Los bovinos criollos poseen amplios beneficios en cuanto condiciones del medio ambiente en relación a la rusticidad, sobriedad, capacidad de parto y su buena capacidad maternal. Multipropósito; sin embargo, uno de los problemas es la pérdida genética por realizar cruzamientos inadecuados con razas bovinas exóticas (3). Así mismo; existen pocos programas para el ganado criollo referidos a la conservación de la biodiversidad. La producción *in vitro* de embriones siendo una herramienta disponible que permite acortar tiempos para la obtención de progenies, esta tecnología es poco o nada utilizada a bovinos criollos, en las razas bovinas que se utiliza solo alcanza 30 a 40% de preñez (26). Además las vacas criollas alcanzan tardíamente a la edad del primer parto, siendo este 35.7 meses (3). La hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) tiene una similitud a la LH, posee una vida más larga (27). Cuando esta gonadotropina está en niveles basales, el ovocito no será capaz de reiniciar la maduración meiótica, no podría romper la envoltura nuclear, ni eliminaría el primer corpúsculo polar, tampoco desarrollaría la metafase II de la meiosis (28). Respecto al tamaño folicular, varios investigadores recuperan ovocitos desde tamaños de 4 a 6 mm de diámetro (29); sin embargo, se pueden recuperar de folículos menores a 4 mm, incluyendo 1mm, estos pueden llegar a madurar *in vitro* (14, 30). Si a los folículos menores a 4 mm de diámetro no se llegan a recuperar los ovocitos, significaría una gran pérdida; por tanto, el diámetro folicular, la recuperación de ovocitos, maduración y el potencial para desarrollar los embriones, requieren ser investigados a mayor profundidad (31), a todo ello la producción de embriones *in vitro* dentro de ella maduración *in vitro*. es una tecnología para mejorar la reproducción y la genética bovina, incluido el aumento de la disponibilidad de productos animales para el consumo humano, la superación del problema de la infertilidad del ganado de gran valor comercial y el aumento de la eficiencia reproductiva en los animales (28); sin embargo, en la maduración *in vitro* de ovocitos hay factores que afectan como es el caso del intervalo de tiempo de la maduración *in vitro*, momento de la aspiración, control de hormonas (32), escasa capacidad de ovocitos para madurar, ovocitos defectuosos, condiciones de cultivo durante la MIV (33); por otra parte, se menciona el porcentaje de viabilidad de la MIV en el ganado supera el umbral del 30 al 40% (34).



1.2 Enunciado del problema

1.2.1 Problema general

¿Cómo será la maduración *in vitro* de ovocitos recuperados de diferentes tamaños foliculares y sometidos a medio de maduración con diferentes concentraciones de hCG?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Cuál será el número de ovocitos recuperados de folículos de tamaños ≤ 2 mm y $>2-8$ mm
- ¿Cómo será la maduración *in vitro* de los ovocitos recuperados de folículos de diferentes tamaños ≤ 2 mm y $>2-8$ mm y suplementados con concentraciones de 0, 5 y 15 UI/mL de hCG?

1.2.3 Justificación de la investigación

La diversidad biológica ganadera es sustancial para garantizar la estabilidad alimentaria y la vida tradicional de los comuneros (35). El ganado bovino Criollo representa una diversidad biológica importante en el ecosistema de todo el mundo. Este evolucionó naturalmente consumiendo alimentos de baja calidad, sobreviven en tiempos donde el clima se vuelve extremo (36). Hay la necesidad de mantener y mejorar el ganado bovino Criollo, a través de bancos de germoplasma que permitan su conservación (3), dado que están en riesgo de extinción, por tal motivo es una alternativa el uso de la biotecnología reproductiva, que comprende la MIV, FIV y producción *in vitro* (PIV) (37), siendo esta una herramienta en los programas de mejora genética (38).

Las gonadotropinas participan activamente, en la madurez y el desarrollo de los ovocitos de los bovinos y demás especies, por lo que es necesario suplementar con gonadotropinas al medio de maduración *in vitro* (39). LH estimula la progresión de la meiosis en el oocito desde la profase a metafase II, disminuye el cAMP permitiendo la maduración del ovocito (40), así mismo la hCG es utilizada para simular el pico endógeno de la LH, debido a las similitudes estructurales entre estas (41), además la hCG posee una mejor afinidad por los receptores de LH (42). No solo la hCG tiene similitud a la LH, también la eCG; sin embargo, a pesar de la homología de aminoácidos, tiene una menor actividad que la LH y más de FSH (43).



Por otro lado, el tamaño folicular expresa importancia en la maduración *in vitro*. Se evidencia que folículos pequeños (menores a 4 mm) podrían poseer la capacidad de maduración de ovocitos (14, 30), así como los ovocitos obtenidos de folículos de 1-2 mm y 3-4 mm (37). Así mismo, Ayala *et al.* (44) señalan que los ovocitos de tamaños foliculares menores a 4 mm, 1 y 3 mm (45), son una fuente prometedora para llegar a una maduración nuclear. Por lo tanto, la suplementación de hCG en sus diferentes concentraciones, y el tamaño folicular podrían estar involucrados en la maduración *in vitro* que requieren ser investigados. Cuyos resultados pueden contribuir en la producción de embriones *in vitro* para la conservación o selección de ganado criollo.



CAPÍTULO II OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivos de la investigación

2.2.1 Objetivo general

Evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos recuperados de diferentes tamaños foliculares y sometidos a medio de maduración a diferentes concentraciones de hCG.

2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar el número de ovocitos recuperados de folículos de tamaños ≤ 2 mm y $>2-8$ mm.
- Determinar la maduración *in vitro* de los ovocitos recuperados de folículos de diferentes tamaños ≤ 2 mm y $>2-8$ mm y suplementados con varias concentraciones de 0, 5 y 15 UI/mL de hCG.

2.2 Hipótesis de la investigación

2.2.3 Hipótesis general

La maduración *in vitro* de ovocitos recuperados de diferentes tamaños foliculares y sometidos a medio de maduración a diferentes concentraciones de hCG son diferentes.

2.2.4 Hipótesis específicas

- Se recupera mayor número de ovocitos de folículos mayores a 2-8 mm de diámetro.
- Se obtiene mayor número de ovocitos madurados *in vitro* con 15 UI/mL de hCG.



2.3 Operacionalización de variables

Tabla 1. Operacionalización de variables de estudio

Variable	Indicador
Independiente	
Tamaño folicular	Folículos de ovarios de vacas criollas ≤ 2 mm y $>2-8$ mm de tamaño.
Concentración de hCG	Cantidad de hormona gonadotropina coriónica humana en el medio de maduración 0, 5 y 15 UI/mL
Dependiente	
Ovocitos aspirados	Número de ovocitos aspirados por ovario.
Maduración ovocitaria	Expansión de cúmulos del ovocito durante la maduración <i>in vitro</i> . Grado 1; grado 2; grado 3

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

3.1 Antecedentes

- a) El objetivo fue la evaluación de cinco suplementos de FSH-LH, Pergonal, suero de vaca en estro, hCG y suero fetal bovino (SFB), en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. se obtuvo los ovocitos por aspiración folicular de ovarios y clasificados estos ovocitos en categorías A y B, se usó hCG 10 UI/mL en medio de maduración para el tratamiento hCG, Se colocaron 25 ovocitos en cada gota de medio de maduración, con un total de 50 ovocitos por tratamientos, posteriormente se colocaron en la estufa con 5% de CO₂ a 38°C, y con 90% de humedad. Este proceso de maduración tuvo una duración de 24 horas. Los resultados fueron: para la FSH-LH, 86% expandidos, 14% semiexpandidos y 0% no expandidos; Pergonal, 94% expandidos, 6% semiexpandidos y 0% no expandidos; Suero de vaca en estro, 26% expandidos, 74% semiexpandidos y 0% no expandidos; hCG, 62% expandidos, 38% semiexpandidos y 0% no expandidos; SFB, 48% expandidos, 52% semiexpandidos y 0% no expandidos; respectivamente (24).
- b) Con el objetivo de evaluar el efecto de un periodo de preincubación por 6 horas de ovocitos bovinos, que tuvo como medio de maduración *in vitro* es el siguiente; cultivo de tejidos (TCM-199) suplementado con 275 µg/ml de ácido pirúvico, 29.2 µg/ml de glutamina, 10 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de selenio, 5.5 µg/ml de transferrina, 1 µg/ml de estradiol, 10% de suero bovino fetal y 0.5 µg/ml de FSH porcina. Luego de este período de seis horas, los COC fueron transferidos a gotas de medios de maduración, los ovocitos fueron aspirados de folículos de 3 a 6 mm se sometieron complejos cúmulo oocito (CCO) inmaduros a MIV compuesto por medio TCM 199, utilizando 10 UI/mL de LH en su medio de maduración con condiciones de cultivo que fueron de 38.5 °C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa por un período de 24 horas. Los resultados fueron para la pre incubación + MIV 88.4% de expansión y para el MIV de 40.8%, respectivamente (23).
- c) El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del YM976 como inhibidor específico de la fosfodiesterasa tipo 4 (PDE-4) sobre la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos y su capacidad de desarrollo embrionario. Para ello, complejos cúmulo-oocito se obtuvieron por aspiración folicular de ovarios. Se maduraron *in vitro* por 24 horas en medio TCM-199 suplementado con cuatro concentraciones de YM976 (1, 10, 100 y 1000 nM) o con

gonadotropinas (LH y FSH) en el medio de maduración usaron 5 UI/ml de hormona luteinizante. El porcentaje de expansión grado 3 de las células de cúmulo en oocitos cultivados con gonadotropinas fue diferente ($p= 0.00016$) respecto de los cultivado en presencia del YM976 que en la maduración *in vitro* de oocitos retrasa la expansión de las células de la granulosa, pero permite una maduración nuclear y competencia para el desarrollo embrionario. siendo el resultado para las gonadotropinas en promedio \pm DE para el grado 1: 1.63 ± 0.48 , grado 2: 17.22 ± 16.11 y grado 3: 81.12 ± 15.07 , respectivamente (22).

- d) El objetivo del estudio fueron evaluar el efecto de la hCG en capacidad de reanudación meiótica de los ovocitos bovinos, estos ovocitos fueron aspirados de ovarios derivados de los folículos medianos (3-7 mm de diámetro). Los complejos cúmulo-ovocito se lavaron tres veces en medios de maduración que contengan TCM-199 complementado con 1% de albumina sérica bovina (BSA), 0.05 μ g/ml de gentamicina. Se complementaron con o sin hCG en diferentes concentraciones (0, 5, 10 y 15 UI/ml). Grupos de 10-20 COCs fueron colocados en gotas de 100 μ L de medio de maduración bajo aceite mineral y se incubaron durante 22 horas a 39 °C, 5% CO₂ en aire. Los resultados de maduración meiótica fue del 39.5, 51.2, 70.2 y 52.7%, respectivamente (46).
- e) El presente estudio se realizó para examinar la maduración potencial de los ovocitos de alpaca derivados de folículos grandes (2-8 mm), pequeños (<2 mm), Los ovarios se recogieron del matadero y se transportaron a 10 °C durante 22 h. COC se obtuvieron por aspiración de folículos grandes (2-8 mm), mientras que los COC de folículos pequeños (<2 mm) mediante la realización de secciones superficiales en la corteza del ovario tras la MIV durante 32-36 h a 38,5 °C. no se observaron diferencias significativas en la tasa de metafase II (18.1% vs 22.1%), respectivamente (47).
- f) En un estudio realizado se evaluó la capacidad de los ovocitos bovinos de folículos según su tamaño para reiniciar la meiosis. La aspiración se realizó por grupo con una aguja 21G conectada a una bomba de vacío, con una presión de 65 mmHg. Los COC recuperados se clasificaron como adecuados y no adecuados para la producción de embriones *in vitro*, de acuerdo con las características del cúmulo y del citoplasma. Los COC elegibles e inadecuados se valoraron con la prueba de azul brillante de Cresilo (BCB) y se clasificaron en BCB+ y BCB- Los folículos se midieron y clasificaron como

grupo 1 (G1 <4 mm), grupo 2 (G2 4- 8 mm) y grupo 3 (G3 >8 mm), el medio de maduración consistió en TCM 199 suplementado con 10%, BSA al 1%, 100 µg/ ml de piruvato de sodio, 0.75 mg/ml de L-glutamina, 4 µg/ml de FSH-p (Folltropin®, Bioniche, Canadá), 2 µg/ml de estradiol y 250 µg/ml de gentamicina por 24 h en una cámara de maduración controlada al 5% de CO₂ , 90% de humedad y 38.5 °C, los resultados obtenidos no tuvieron significancia entre estos tamaños foliculares en la maduración meiótica como se ve a continuación G1: 13.9 ± 1.41 (74.9%), G2: 13.5 ± 1.78 (75.6%) y 2.6 ± 0.35 (61.7%), Se concluye que los ovocitos de folículos entre 4-8 mm (G2) proporcionan un mayor porcentaje de COC maduros; sin embargo, el 50% de folículos <4 mm (G1) son una fuente prometedora de ovocitos viables, por lo que deben usarse para la producción de embriones *in vitro* respectivamente (44).

- g) Se realizó un estudio como objetivo fue evaluar la capacidad de maduración *in vitro* de ovocitos obtenidos de tres tamaños foliculares (1-2mm, 3-4mm y 5-6mm) de ovarios bovinos colectados, del centro de beneficio, en un recipiente isotérmico conteniendo cloruro de sodio al 0.9% (wt/vol) con 0.025 mg/ml de estreptomicina, temperado a 37 °C. En el laboratorio, los ovarios fueron nuevamente lavados en cloruro de sodio al 0.9%. Luego, se aspiraron los COCs usando una jeringa de 10 ml y una aguja de 18 G con medio de manipulación HEPES suplementado con 50 mg/ml de gentamicina y 10% (vol/vol) SFB. Los COCs fueron aspirados separadamente a partir de tres tamaños foliculares de la superficie del ovario; 1- 2, 3-4 y 5-6 mm, los cuáles fueron medidos con una regla, fueron madurados con TCM199 suplementado con 0.25 mg/ml de piruvato de sodio, 50 ug/ml de gentamicina, 0.01UI/ml de FSH, 0.01UI/ml de LH, 0.1 mg/ml de glutamina, 10 ng/ml factor de crecimiento epidermal (EGF), 1 ug/ml de 17β-estradiol y 10% SFB. posteriormente fueron madurados por 24 horas en una atmósfera húmeda, 5% CO₂ y 38.5°C. Como resultados, los ovocitos de tamaños foliculares de 1- 2 mm y 3-4 mm. presentaron significativamente mayor competencia meiótica que aquellos procedentes de los folículos de 5-6 mm, logrando un porcentaje de maduración de 89, 85 y 25%, en conclusión, se demostró los ovocitos procedentes de folículos de 1- 2 y 3-4mm presentaron mayor competencia meiótica respectivamente (37).

3.2 Marco teórico

3.2.1 Importancia del bovino criollo peruano

La genética bovina tendría la capacidad de ayudar la generación de líneas, está orientada a tipos cómo la producción de leche, carne, doble propósito, porque en ellas

se guardan genéticas de tipo carácter de adaptación y habilidad materna, siendo así el ganado criollo nativo es un animal que brinda una base genética para su mejoramiento, aprovechando así la característica de adaptación al medio adverso gracias a su rusticidad (48). Un animal adaptado a definido ambiente constantemente tiene propiedades fenotípicas distintivas que indican habituación a un determinado ámbito. Conociendo éstas el criador va a poder elegir los animales, evitando el riesgo de incorporar ejemplares no adaptados (49).

3.2.2 Fisiología reproductiva de la hembra bovina

Los cambios en las estructuras ováricas y reproductivas durante el estro siguen estando sustancialmente determinados por el sistema endocrino, debido a la relación entre el eje hipotálamo-pituitario y la cooperación ovario-uterina involucrada hormonalmente (50).

3.2.3 Ovarios

Comúnmente cada hembra tiene 2 ovarios o glándulas sexuales femeninas, productoras tanto de óvulos como de hormonas sexuales (estrógenos, progesterona y relaxina) y por consiguiente se llaman órganos gameto hormonales. En las vacas adultas tienen un promedio de 3 – 4 cm de longitud, unos 2.5 cm de ancho y 1.5 cm-2 cm de espesor. El peso de los ovarios además cambia entre 6.15 – 20 g el ovario derecho, por lo regular es más grande que el izquierdo (51), esto se debería a una funcionalidad fisiológica más activa que posee el ovario derecho (52), con la edad incrementan tanto su tamaño como su peso, debido al aumento del tejido intersticial, lo cual establece además un crecimiento de la consistencia (51).

3.2.4 Ciclo estral bovino y su influencia en los ovocitos

El periodo estral de la vaca representa un patrón frecuente de actividad ovárica que posibilita ir de una época de no receptividad reproductiva a uno de receptividad, permitiendo implantar el apareamiento y el subsecuente establecimiento de la gestación. Se caracteriza por el crecimiento y la regresión de folículos y cuerpo lúteo en un promedio de 21 días, este ciclo estral en el ganado dura de 18 a 24 días. Consta de una fase lútea (14-18 días) y una fase folicular (4-6 días) y está compuesta por cuatro etapas proestro, estro o celo, metaestro y diestro (53). parece influir sobre la competencia de los ovocitos la etapa del ciclo estral en la que se encuentra la hembra, aunque generalmente este aspecto no se tiene en cuenta a la hora de recolectar

ovocitos (54), en cambio Rodríguez (55), demuestra que la fase del ciclo estral no parece influir ni en la cantidad ni en la calidad de ovocitos recuperados. Esto nos indica que, a pesar del espacio que ocupan el cuerpo lúteo durante la fase lútea en gran parte del ovario y a la acción de inhibición ejercida por la progesterona sobre el crecimiento de los folículos.

3.2.5 Factores que afectan la producción y calidad de los ovocitos

Dado que la producción de ovocitos ocurre durante el ciclo de vida de animales, todos los factores que la afectan pueden tener un efecto más o menos significativo en la producción y calidad de los ovocitos. La reproducción animal es un proceso que requiere mucha nutrición para su normal funcionamiento, por lo que cualquier cambio, ya sea externo o interno, normal o patológico, puede afectar directa o indirectamente la producción de ovocitos (56).

3.2.5.1 Técnica de aspiración de ovocitos

Cuando se analiza la eficiencia de la producción de embriones bovinos *in vitro* a escala comercial, es fundamental considerar el método utilizado y la técnica de recuperación de ovocitos. Entonces, para un verdadero éxito, se realizan intentos para determinar el origen válido del ovocito. Por lo tanto, se están explorando técnicas invasivas y no invasivas para recolectar de manera efectiva estas estructuras (57).

3.2.5.2 Aptitud productiva

Debe tenerse en cuenta que, bajo este epígrafe, aptitud productiva, se describen dos aspectos estrechamente relacionados. Por un lado, la especialización de los animales para tener una determinada producción (carne o leche) (55). La selección intensiva para la producción de leche en novillas llevó a que encontráramos una gran proporción de animales con un balance energético profundamente negativo, creando un conflicto de interés entre la producción de leche y la eficiencia reproductiva. De hecho se observó que vacas de carne tenían mejor fertilidad que vacas lecheras (58).

3.2.5.3 Fase del ciclo estral

En el ciclo estral de la vaca la fase lútea presenta una duración de 14 a 18 días. A lo largo de esta etapa se destaca el cuerpo lúteo en menor o mayor

desarrollo. Por su lado, a lo largo de la etapa folicular, con una duración de 4 a 6 días, se genera la maduración y desarrollo completo del folículo dominante (con regresión progresiva corporal lúteo) y la consecuente ovulación (53).

3.2.5.4 Peso de los ovarios

Existen evidencias indirectas que indican que el número de folículos durante las oleadas foliculares se encuentra condicionado por el tamaño de sus ovarios (59). De manera semejante otro estudio describió que la proporción de ovocitos recuperados y el porcentaje del COC de buena calidad disminuía significativamente según el tamaño de los ovarios (60).

3.2.5.5 Edad de la donante

Algunos investigadores recomiendan utilizar ovocitos de novillas de 11 meses para producir embriones *in vitro*, con resultados similares a los de vacas adultas (61).

3.2.5.6 Condición corporal

La calidad del óvulo depende de la actividad hormonal de estas hormonas. Por lo tanto, una vaca en mal estado puede tener un nivel de energía indeseable que afecte el eje hormonal y por ende el folículo-ovocito (62). La condición del cuerpo debido al desequilibrio nutricional está relacionada con el crecimiento de los folículos ováricos, lo que puede afectar la capacidad de los ovocitos; parte de ese cambio parece deberse a cambios moleculares que alteran el microambiente del ovocito en crecimiento y maduración (63).

3.2.6 Escalas de evaluación de la condición corporal

Para evaluar la condición corporal en forma idónea de un régimen de alimentación para vacas lecheras, considerando que el ganado lechero deposita sus reservas de energía alrededor del área pélvica, se utiliza el puntaje estándar de evaluación de la condición corporal; normalmente la puntuación que se utiliza está en una escala de 1 a 5, siendo 1 demasiado delgada y 5 demasiado gorda. Una vaca ideal tiene un puntaje de condición del cuerpo de alrededor de 3.5, sin embargo el sistema es

creado para tener vacas en ciertas fases de la lactación en ciertas condiciones corporales (64).

3.2.7 Crecimiento folicular y ovulación

Desde la formación fetal hasta la ovulación ocurre el proceso de crecimiento folicular, pareciera que la foliculogénesis no dependería de las gonadotropinas, el cual es regulado por el factor interno TGF β , GDF-9, BMP originados por los ovocitos, este proceso prosigue gracias a IGF-1, EGF, TGF α , inhibina y activina y otros. Se da que las foliculogénesis dependientes de gonadotropinas son afectadas por ella, y está dada por tres etapas; reclutamiento, selección y dominancia. Estos folículos terminan en atresia casi 99% (65). La ovulación se inicia con el pico preovulatorio de LH, el cual, paralelamente, es inducido por la alta concentración de estrógenos circulantes elaborados por el folículo preovulatorio en un ambiente de baja concentración de progesterona circulante. Este pico induce marcados cambios en el folículo que integran tanto la reiniciación de los procesos de maduración del ovocito, alteraciones funcionales en el complejo ovocito-células del cúmulo, modificaciones en la expresión génica de las células de la granulosa que las llevarán hacia la luteinización y otros cambios que ocasionarán al final la separación de la pared folicular (66).

3.2.8 Foliculogénesis

La foliculogénesis es el proceso de incremento del folículo y su pasaje por medio de los diversos estadios de desarrollo, a partir del instante del cual que surge de la reserva de folículos formados a lo largo de la ovogénesis, hasta que es ovulado o entra en atresia (regresión o muerte del folículo). Previamente del origen, las células germinales principales u ovogonias cesan su separación mitótica y empiezan el proceso de meiosis, quedando arrestados en la profase de la primera división meiótica es en este instante donde se denomina ovocito primario (67).

La foliculogénesis comienza durante el desarrollo fetal, las células germinales primordiales colonizan la gónada primitiva en la quinta semana aproximadamente, luego por mitosis dan lugar a las ovogonias, seguido del nacimiento y entrando en la vida reproductiva, entran en el período de rápido crecimiento que da origen al folículo primordial. al folículo de Graf. El folículo primordial, alrededor de los 90 días, en la vaca se presentan folículos primordiales bien formados del folículo

primordial desarrolla un folículo primario, luego un folículo secundario, seguido de un folículo antral hasta llegar a folículo preovulatorio (68).

3.2.9 Clasificación de los folículos

Diferentes etapas del desarrollo folicular escrito en muchas categorías de nomenclatura distinta, aquí presentamos las categorías más utilizadas nivel internacional.

3.2.9.1 Folículo primordial

Son estructuras casi ovaladas, están constituidas por un ovocito en crecimiento que se detuvo en una fase de diploteno de la profase I de la meiosis, la cual está rodeada por una sola capa de células epiteliales foliculares pregranulosas (69). En bovinos, se observa un promedio de 5 células pregranulosas en la sección que corta al folículo primordial por su mayor diámetro en total, el complejo presenta menos de 10 células planas pregranulosas. El diámetro del ovocito en esta etapa es de unos 30 μm , mientras que el folículo primordial tiene un diámetro total menor a 40 μm (70).

3.2.9.2 Folículo primario

Consisten en un ovocito rodeado por una capa cúbica de células de la granulosa. El tamaño del folículo aumenta a aprox. 40-80 μm rodeado de 10-40 células de la granulosa. Células cuboides de la granulosa se dividen en varias capas alrededor del óvulo (folículo multilaminar) (70).

3.2.9.3 Folículo secundario

Tienen varias capas de células de la granulosa, que a su vez están rodeadas por células de la teca (células fusiformes, más largas que las células de la granulosa) y el folículo aumenta de tamaño (80 a 250 μm). Las células de la granulosa comienzan a segregar líquido (líquido folicular), que poco a poco va formando espacios entre ellas; estos espacios luego se fusionan en una cavidad conocida como antro folicular; estas células, a su vez secretan mucopolisacáridos, que forman un halo protector (zona pelúcida) alrededor del ovocito (71).

3.2.9.4 Folículo antral

El antro folicular va en crecimiento hasta adquirir las características de folículo preovulatorio o folículo de Graff, el antro se forma a partir de folículos de 0.2-0.4 mm de diámetro en bovinos; por tanto, ya el ovocito adquiere una medida de 93 μm (70). Los folículos preovulatorios normalmente tienen una medida de 15 mm en animales adultos (72).

3.2.10 Ovogenesis

La ovogénesis incluye en total 3 fases. Proliferación, crecimiento y maduración (51). Con ello ovocito estaría preparado para fertilización y consecuente a ello al desarrollo embrionario. La ovogénesis comprende varias fases; la fase proliferativa donde las ovogonias se dividen rápidamente, otra es la fase meiótica donde se realiza la formación del ovocito primario, la última fase es una intensa degeneración de las células germinales primordiales. En esta fase degenerativa, aquellos ovocitos que sobreviven arrestados el en estado de diploteno de la meiosis I, la cual está rodeada por capa simple de la granulosa y se llama a su vez folículo (73).

3.2.11 Ovocito

El óvulo u ovocito es el gameto femenino ovulado, un ovocito secundario que se encuentra en la fase de metafase, listo para realizar la fecundación, el ovocito es la célula de mayor tamaño de los mamíferos, varias capas de células de granulosa se ubican alrededor formando el complejo cúmulos ovocito (74).

3.2.11.1 Ovocito primario

Los ovocitos primarios son un resultado de la diferenciación de la ovogonia, durante la primera división meiótica, en la cual hay una reducción de la cantidad de cromosomas a ser haploides dicho proceso se da en el folículo primordial siendo la iniciativa para la meiosis incluyendo la replicación del ADN y la respectivo arresto meiótico en diploteno de la profase I (estado dictioteno) (75).

3.2.11.2 Ovocito secundario

Antes de la ovulación da por finalizado la primera división meiótica y se forma el ovocito secundario y el primer corpúsculo polar,



rápidamente empieza la segunda división meiótica, deteniéndose en la metafase II (76). El ovocito secundario muestra cromosomas haploides, es decir que tiene la mitad de cromosomas que poseía la célula original. En el proceso de ovulación, el núcleo del ovocito secundario iniciará la segunda separación meiótica donde solo avanzará hasta la metafase, este es el instante donde se detiene. Solo si un espermatozoide ingresa el ovocito secundario completará a la segunda división meiótica (77).

3.2.12 Maduración de ovocitos

En este proceso de la maduración de ovocitos se efectúa gradualmente la capacidad de madurar, ser fertilizado y por último convertirse en un embrión viable durante la diferenciación progresiva que se da en la foliculogénesis. Dicho proceso inicia con el crecimiento de los ovocitos durante las primeras etapas del desarrollo folicular. A medida que el ovocito llega a su tamaño final, ocurren modificaciones, menos resaltantes, pero si son necesarias para determinar la capacidad del ovocito y así lograr su propósito reproductivo (78).

Es la rotura del folículo maduro y la liberación de su óvulo y las células del cúmulo, lo cual ocurre alrededor del día 14. Los cambios que ocurren el día anterior lo hacen posible: Los estrógenos, mediante retroalimentación positiva, dan lugar al pico de LH y a la secreción de FSH en la adenohipófisis, La LH induce varios acontecimientos. El ovocito primario completa la meiosis I, produciendo el ovocito haploide secundario y el primer corpúsculo polar, mientras que el líquido folicular aumenta con rapidez, y el folículo incrementa su tamaño. Las paredes del folículo y el tejido ovárico adyacente se debilitan por la inflamación y la acción de las enzimas proteolíticas. Los folículos maduros revientan cuando aumenta la presión interna y las paredes se debilitan; mientras tanto, las trompas de Falopio se preparan para recibir el óvulo liberado al expandirse alrededor del ovario (79).

3.2.13 Maduración nuclear y citoplasmática del ovocito

La MIV es una tecnología aplicada en técnicas de reproducción humana asistida, siendo un procedimiento por el que los ovocitos inmaduros que proceden de folículos antrales, se extraen y se maduran en el laboratorio. Los adelantos en la metodología de MIV ovocitaria han permitido la práctica rigurosa de la MIV por la que, los ovocitos inmaduros, que proceden de pequeños folículos antrales, en

agrupación a ciclos de fecundación *in vitro* no estimulados (o con una mínima estimulación ovárica controlada), son inducidos a madurar por medio de complicados sistemas de cultivo *in vitro* (80).

Al nacimiento de la hembra, los ovocitos de las especies mamíferas permanecen bloqueados en la etapa G2 (diploteno) de la profase de la primera división meiótica y deben reiniciar y terminar la meiosis y la maduración para que la fecundación logre llevarse a cabo. La competencia meiótica, o la capacidad de los ovocitos para reiniciar y terminar la meiosis, se consigue progresivamente a lo largo del aumento folicular y ovocitario y está vinculada a una secuencia de cambios nucleares y citoplasmáticos. Los primordiales cambios nucleares integran la separación de la vesícula germinal (GV), condensación cromosómica y progresión a metafase I (MI), extrusión del primer corpúsculo polar y bloqueo en la metafase de la segunda división meiótica (MII). In vivo, el reinicio de la meiosis es causado por el pico preovulatorio de LH. In vitro, el reinicio de la meiosis y la maduración poseen sitio de forma espontánea luego de retirar físicamente al ovocito del folículo. En el ovocito bovino, solo aquellos que provienen de folículos de un diámetro mayor a 2 mm son meióticamente competentes. Por otro lado, esos ovocitos con un diámetro inferior o los ovocitos corticales no adquieren plenamente la competencia meiótica. Por cierto, ciertos de dichos ovocitos son capaces de realizar una meiosis parcial llegando hasta MI, empero pocos son capaces de llegar hasta MII y, menos todavía, de realizarse hasta estadio de blastocisto. Durante la maduración citoplasmática hay una reorganización de los organelos citoplasmáticos, empieza la síntesis de proteínas concretas y se genera un aumento de la actividad de las quinasas, iniciándose complicadas cascadas de fosforilación y desfosforilación de proteínas específicas que involucran a varias quinasas como el metaphase promoting element (MPF), el núcleo familiar de las mitogen-activated protein kinases (MAPK, MAPKK, MAPKKK), el elemento citostático (CSF), el AMPc y el receptor del epidermal growth component (EGFR). Se estima que estas cascadas de fosforilación activan moléculas reguladoras nucleares y ooplasmáticas, dando la capacidad del ovocito para ser fecundado *in vitro* hasta el estadio de blastocisto (81).



3.2.14 Método de obtención de ovocitos

Los ovarios se pueden obtener de hembras sacrificadas en el matadero. Los ovocitos se obtienen usando las siguientes técnicas.

3.2.14.1 Aspiración folicular

El procedimiento de aspiración, se basa en la succión de los folículos situados en el área del ovario mediante una aguja. El diámetro de la aguja usada es considerado fundamental a efectos de no influir los ovocitos recogidos (82).

3.2.14.2 Slicing

Esta técnica también se le llama de corte o slicing ovárico, los cortes pueden ocurrir en una variedad de orientaciones, longitudinal o vertical, y dado que el ovocito es un área integrada, inclusive se puede usarse luego de la aspiración folicular en el que se recibe el triple de ovocitos ya que se obtienen ovocitos del área integrado los presentes en la corteza ovárica (83).

3.2.14.3 Aspiración transvaginal ecoguiada (OPU)

Esta técnica de aspiración folicular por OPU se basa en el uso de un transductor de ultrasonido en la base de la cúpula vaginal caudal al cuello uterino, y la aguja atraviesa la pared vaginal hasta que se punciona el folículo o folículos. El ovario debe extraerse manualmente del recto, fijarse a un transductor, escanearse el ovario y el folículo y observarse con un monitor de ultrasonido, y aspirarse el contenido del folículo en un tubo de recolección con una bomba de vacío (83).

3.2.15 Evaluación de ovocitos para maduración *in vitro*

La evaluación o selección de óvulos es parte de la producción de embriones *in vitro*. Las vacas ovulan ovocitos individuales hasta el punto de la punción folicular, que puede sufrir degeneración. Por esta razón, es importante considerar esto previo a la maduración *in vitro*, ya que parte de esta población tiene la capacidad de fertilizar y desarrollar embriones (84).

Hay 2 criterios de selección de ovocitos de acuerdo a su aspecto su citoplasma y las características del cúmulo, es decir el número de capas de la granulosa;



según Hawk y Wall (85), clasifica en tres tipos los ovocitos; categoría A: calidad buena; B: calidad intermedia; C: rechazados.

Por otra parte califican en 4 grados o categorías; Grado I: una vez que hay cúmulus con más de 3 capas de células de granulosa, acompañado de citoplasma con granulaciones pequeñas homogéneas; Grado II: una vez que muestra parcialmente cúmulus compacto, con menos de 3 capas de células de granulosa, con citoplasma y granulaciones heterogéneas; Grado III : presencia de cúmulus expandido, con citoplasma limitado, fragmentado o degenerado; Grado IV: el ovocito no muestra células del cúmulus, es desnudo (38).

Tabla 2. Criterios para la clasificación de ovocitos de acuerdo a las características morfológicas previa a la maduración (85).

Tipo de ovocito	Características del cúmulo	Características del ovocito
(A)	“Compacto, con varias capas de células. Con Granulosa adherida es permisible si el citoplasma se ve claramente”.	“Homogéneo, denso y finamente granulado”
(B)	“Grueso usualmente con granulosa adherida, pero el citoplasma no se ve claramente; cúmulo compacto, con pocas a varias capas, cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida”.	“Rango desde homogéneo denso y finamente granulado a granulado de tamaño moderado”.
(C)	“Parcial o completamente expandido con cúmulo disperso, falta de células con presencia de material extracelular, cúmulo descolorido (café claro o muy oscuro); corona radiada sin cúmulo; ovocitos desnudos”.	“Granulado grueso o con mezcla de muy claras o muy oscuras; citoplasma descolorido (café claro u oscuro); ovocitos deformes”



3.2.16 Características de un ovocito maduro

Un ovocito maduro debe alcanzar tanto la madurez citoplasmática como nuclear. En la madurez nuclear se da con el reinicio de la primera división meiótica hasta llegar a la metafase II y se reconoce con la formación del primer corpúsculo polar; por otra parte, la madurez citoplasmática se aprecia, de forma indirecta la uniformidad del citoplasma junto con el grado de expansión de las células del cúmulo y un aumento del espacio perivitelino, para la fecundación se requiere de ambos procesos de madurez (86).

3.2.17 Parámetros de evaluación de un ovocito maduro

Hay diferentes criterios de evaluación de la maduración *in vitro* de ovocitos, algunos optan por evaluar en base a la identificación de la estructura del COC, el citoplasma del ovocito, el espacio perivitelino, la zona pelucida, el cuerpo polar y el uso meiótico (87); así mismo, cromosomas en metafase II (22, 88), por presencia de corpúsculo polar (89, 90) y expansión de las células del cúmulo (22–24, 89, 91–93). El criterio de expansión del cúmulo (figura 1) es el siguiente por Lorenzo (92).

- Expansión nula. No existe expansión apreciable del cúmulo.
- Pequeña expansión de aproximadamente un diámetro del ovocito.
- Expansión apreciable, de unos dos diámetros del ovocito.
- Expansión máxima, de más de tres diámetros del ovocito, e incluso de las células de la corona radiada.

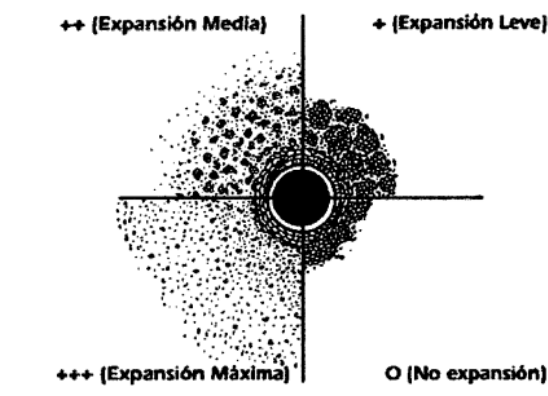


Figura 1. Valoración de la expansión del cúmulo (92).

Tradicionalmente, la valoración de la maduración del ovocito se ha basado en el grado de expansión del cúmulo y la corona que lo rodea (93).

- Metafase II: células del cúmulo expandidas y luteinizadas.
- Metafase I: células del cúmulo menos expandidas.
- Profase I: células del cúmulo compactadas.

De acuerdo a su expansión del cúmulo la maduración es relativamente similar a la maduración meiótica, ya que la maduración implica no solamente eventos nucleares si no también morfológicos y otros aspectos celulares. otra clasificación propuesta por de Loos (91), es por grados de expansión:

- Grado I (+): expansión del Cúmulus se aprecian células sin elasticidad ni expansión
- Grado II (++) : expansión y elasticidad del cúmulo, donde las células del cúmulo se aprecian con leve expansión y elasticidad.
- Grado III (+++) de expansión y elasticidad del cúmulo donde las células de los cúmulos se aprecian máxima expansión y elasticidad considerándose maduros.

3.2.18 Gonadotropina coriónica humana (hCG)

Conocida también como la hormona gonadotrofina coriónica humana, gonadotropina coriónica humana o coriogonadotropina, está conformada por 2 cadenas de aminoácidos alfa y beta teniendo uniones no covalentes por un puente sulfidrilo, que si estas se separan no poseerán actividad; en otras palabras, que ninguna de ellas tiene actividad por sí misma, pero estas se vuelven cuando se unen. En esta hormona la subunidad α tiene un parecido con otras hormonas como la LH, FSH y TSH (tirotrófina hipofisiaria); por otro lado la β difiere alas otras hormonas, y es quien otorga la especificidad (94). Tradicionalmente, la hCG ha sido el gold estándar para desencadenar la maduración final de ovocitos en los ciclos incluidos en técnicas de reproducción asistida (27). La hCG se utilizó por varios años para simular el pico endógeno de la hormona luteinizante (LH), debido a que existen considerables similitudes estructurales entre la hCG y la LH humana (41). Las hormonas LH y FSH se utilizan comúnmente para complementar el medio de maduración, solas o en combinación, a diferentes concentraciones, lo que puede dar lugar a discrepancias entre los resultados de diferentes estudios. (95). La hCG posee mayor afinidad por la LH receptor que la LH, y es cinco veces más potente en estimular la actividad cAMP de las células



de la granulosa, y así mismo produciendo la regresión meiótica (42). Cuando las gonadotropinas II que es equivalente a la LH y estas que son análogas la hCG, al incrementarse durante la maduración final de los ovocitos provoca que las células de la granulosa disminuyan en producir el 17 α -estradiol e inicie la producción del esteroide inductor de la maduración por medio de inhibición de la actividad de la aromatasas P450 que sintetiza al 17 α -estradiol (96), la gonadotropina II es la encargada de la rápida expresión del ácido ribonucleico mensajero de la enzima 20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en las células de la granulosa y el esteroide que sintetizan actúa sobre los receptores ubicados en la membrana plasmática del ovocito en la cual el complejo esteroide-receptor al unirse con la proteína G produce la activación del factor promotor de la maduración, ubicado en el citoplasma del ovocito (97).

Otras gonadotropinas también son utilizadas en la maduración *in vitro* de ovocitos, ya sea en otras especies, teniéndose así la influencia de hormonas foliculo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica equina (eCG) en la maduración *in vitro* de ovocitos y clivaje de embriones de alpacas (98), la hCG en alpacas (99). Referimos a la eCG que posee una vida media prolongada y un efecto similar a la FSH, esta hormona es producida por las copas endometriales de la placenta de la yegua, tiene una actividad biológica mixta, con una tendencia mayor a FSH y menor efecto LH; en cambio la hCG muestra mayor similitud con la LH desde un punto de vista estructural y fisiológico (100), debida esta similitud la hCG es propicio para la maduración *in vitro*. Las ventajas que poseen estas hormonas gonadotropinas, específicamente la hCG es la de su similitud a la LH; por ende, las funciones de la LH mencionadas anteriormente, promueve un factor inhibidor anti-macrófagos, en el crecimiento y desarrollo del cordón umbilical, la hCG tiene una amplia gama de acciones a través del receptor hCG/LH. La hCG y la hCG hiperglucosilada aparentemente actúan juntas para promover el crecimiento y la diferenciación de las células trofoblásticas o la formación de las estructuras vellosas de la placenta y muchos beneficios (101); de igual manera, la eCG cumple funciones de actividad tipo FSH y LH. Su administración estimula el desarrollo de los folículos de tamaño medio y grande e induce la ovulación del folículo dominante, Aumenta las tasas de ovulación y de preñez de vacas no cíclicas. Como parte de un protocolo de sincronización de inseminación programada, aumenta las tasas de concepción en vacas con ovulación retrasada y mejora el desarrollo y la supervivencia del embrión, y

mejora el rendimiento de la técnica en los protocolos de sincronización de embriones receptores (102) y como protocolo de maduraciones *in vitro* (98); así mismo, mejora la MIV, disminuye la apoptosis de los ovocitos sometidos a MIV y aumenta la expresión de FSH receptor, LH receptor (103); por otra parte, a pesar de los grandes beneficios de eCG el uso de esta gonadotropina está prohibido en algunos países; además, el eCG no tiene un patrón de actividad y su costo es extremadamente alto (104); así mismo, una de las desventajas de la hCG es la preparación con esta hormona es que los ovocitos se encuentran en diferentes niveles de maduración en OPU, lo que significa que hay necesidad de hacer múltiples controles para la maduración y luego realizar varias rondas de ICSI cada vez que detecten ovocitos maduros, los cuales aumentan la carga de trabajo del laboratorio y los costos del procedimiento (105).

3.2.19 Medio de maduración

En la maduración de ovocitos *in vitro* el más usado y exitosamente es el medio cultivo tisular (TM199) combinado con sales de Earle`s con 4-(2- hidroxietil)-1 piperazinaetanolfónico (HEPES) y bicarbonato como buffer de pH y suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, proteínas y purinas, el desarrollo óptimo de las células embrionarias se desarrollan en un pH de 7.4; por otra parte, se tiene a otros medios más comunes son el bicarbonato de Krebs-Ringer modificado de dulbecco modificados, F-10 de Ham modificado, de Whitten, basal de Eagle con sales de Hank y medio mínimo esencial modificado con sales de Earl (106).

3.3 Marco conceptual

- a) **Maduración *in vitro* de ovocitos.** Es una técnica reproductiva el cual los ovocitos tendrán la capacidad desarrollar la pre implantación del embrión pudiendo llegar a un desarrollo completo (107).
- b) **hCG.** Es una hormona que está sintetizada específicamente por tejidos embrionarios, pituitaria de las mujeres, células tumorales, tejidos fetales, etc. Es conocida por diferentes denominaciones así como hormona gonadotrofina coriónica humana, coriogonadotropina o gonadotropina coriónica humana (hCG) (94).

- c) **Folículo.** El folículo es la unidad básica del ovario y la estructura que controla las etapas del proceso reproductivo y el ciclo estral (108).
- d) **Tamaño folicular.** es un crecimiento del folículo y en vacunos se observa crecimientos de folículos dominantes de 17.1 mm y 16.5 mm Y 11.3 Y 12 mm en cebuinas (109).
- e) **Bovino criollo.** Respecto al ganado, explicó que el *bos taurus* surgió del apareamiento en América con ganado traído de España durante el descubrimiento y la conquista, y que se adaptaron a diferentes ecosistemas a través del proceso de selección natural. (110).
- f) **Ovario.** los ovarios son principalmente órganos del aparato reproductor femenino, siendo sus funciones primordiales la producción de hormonas tales como los estrógenos y progesterona, en la superficie de este órgano se puede apreciar dos estructuras diferentes siendo los folículos y el cuerpo lúteo (111).

CAPÍTULO IV METODOLOGÍA

4.1 Tipo y nivel de investigación

La investigación es de tipo experimental por que el investigador interviene en la manipulación de la variable de estudio; prospectivo por que los datos son recogidos a propósito de la investigación (primarios) y posee control de sesgo; transversal porque todas las variables son medidas en una sola ocasión (112).

Pertenece al nivel explicativo, porque da a conocer o explica el comportamiento de una variable en función de otra por ser estudios de causa-efecto (112).

4.2 Diseño de la investigación

Se formaron 6 grupos de tratamientos (T), combinados entre tamaño folicular y concentración de hCG. El T1 estuvo compuesto por folículos ≤ 2 mm con concentración de 0 UI/mL de hCG; T2 folículos ≤ 2 mm con concentración de 5 UI/mL de hCG; T3 folículos ≤ 2 mm con concentración de 15 UI/mL de hCG; el T4 con folículos $>2-8$ mm con concentración de 0 UI/mL de hCG; T5 folículos $> 2-8$ mm con concentración de 5 UI/mL de hCG; T6 folículos $>2-8$ mm con concentración de 15 UI/mL de hCG.

Tabla 3. Distribución de los ovocitos de vacunos criollos según tratamiento con tamaño folicular y madurados con diferentes concentraciones de hCG.

Repeticiones	T1 Folículo ≤ 2 mm con hCG 0 UI/mL	T2 Folículo ≤ 2 mm con hCG 5 UI/mL	T3 Folículo ≤ 2 mm con hCG 15 UI/mL	T4 Folículo $>2-8$ mm con hCG 0 UI/mL	T5 Folículo $>2-8$ mm con hCG 5 UI/mL	T6 Folículo $>2-8$ mm con hCG 15 UI/mL
R1	40	40	40	40	40	40
R2	40	40	40	40	40	40
R3	40	40	40	40	40	40
Total	120	120	120	120	120	120

T: tratamiento; R: repeticiones; hCG: hormona coriónica humana



4.3 Población y muestra

La población fue representada por ovocitos de ovarios recolectados de vacas criollas faenadas en el matadero de la Municipalidad Provincial de Abancay, estos vacunos en su gran mayoría poseen condiciones corporales de 1 y 2 es decir vacas demasiadas delgada y moderadas, con respecto a las edades fueron variados, no se consideraron algún parámetro. La muestra fue determinada mediante muestreo no probabilístico por conveniencia representada por 720 ovocitos.

4.4 Técnicas e instrumentos / procedimiento de la investigación

4.4.1 Localización

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Abancay, Perú (13°38'30.7"S 72°53'16.7"W) (113).

4.4.2 Colección de ovarios y transporte

La colección y selección de ovocitos se ejecutaron según Segura (37) con algunas modificaciones. Los ovarios fueron obtenidos de vacas criollas de baja condición corporal faenadas en el Matadero de la Municipalidad Provincial de Abancay, Apurímac, Perú. Los ovarios se colectaron por disección y colocados en NaCl al 0.9% suplementado con gentamicina 50 mg/mL, luego fueron transportados en un termo al laboratorio entre 35 a 37 °C, dentro de 2 a 3 horas posteriores al faenado del animal.

4.4.3 Recuperación y evaluación de ovocitos

Al llegar del lugar de muestreo es decir del camal, los ovarios se transfirieron a un vaso de precipitado de 500 mL con NaCl al 0.9% mantenido en baño María (Wincom, HH-2, China) a 37 °C, luego se lavaron 2 a 3 veces con solución salina para eliminar restos de sangre y otras impurezas de los tejidos. Los ovocitos fueron recuperados de folículos ováricos de ≤ 2 mm y >2 a 8 mm, que fueron medidas con una regla Vernier, para luego con una jeringa de 10 mL y aguja de 18 G, se extraído el líquido folicular conteniendo los complejo ovocitos cúmulos fueron mantenidos en baño María a 37 °C, luego de 12 min aproximadamente fueron aspirados con pipetas Pasteur hacia una placa Petri de 90 x 20 mm, donde se separaron los ovocitos mediante un estereomicroscopio (Meiji Tecnho, EMZ-5, Japón) con un aumento de lente a objetivo 2x o 4.5x, luego los ovocitos fueron lavados con fosfato buffer salino en

cinco gotas sucesivas de 50 μ L mantenidas sobre platina térmica (C & A Scientific - Premiere, HXH-2002, Estados Unidos de Norte América-EUA-) a 37 °C.

La clasificación de los ovocitos se realizó según características morfológicas descritas por Haw y Wall (85), en tres categorías, categoría A: calidad óptima (cúmulos compactos, con varias capas de células); categoría B: regular calidad o intermedia (cúmulos compactos, las células del cúmulo cubre total o la mitad de la zona pelúcida); categoría C: ovocitos rechazados, sin células del cúmulo (poseen expansión parcial o total, ovocito pequeño, descoloridos, citoplasma oscuro, granuloso, o muy claros, amorfos). Los ovocitos de categoría A y B se seleccionaron como adecuados para la maduración *in vitro*, los ovocitos fueron acostumbrados en medio TCM-199 en una placa Petri de 90 x 20 mm, luego fueron transferidos a las placas de maduración.

4.4.4 Maduración *in vitro* de ovocitos

El medio de maduración es una solución madre con condiciones higiénicas usando flujo laminar y filtración estéril, este medio sirve en la producción de embriones *in vitro* de bovinos como una fuente de nutrientes, que cumplen un rol fundamental en la maduración de ovocitos, a esta solución se le suplementan algunos componentes más, este medio consistió en TCM-199, con sales Earle's (Sigma, M-7528), suplementado con suero fetal bovino al 10% (Sigma, F-2442), piruvato 0,2 mM (Sigma, P-4562), gentamicina 50 μ g/mL (Sigma, G-1264), FSH 0.5 μ g/mL, 17 β -estradiol 1 μ g/mL (Sigma, E-4389), más hCG con diferentes concentraciones. El medio fue colocado en una placa Petri (30 x 15 mm), divididos en 7 gotas de 80 μ L de medio, cubiertas con aceite de mineral. Los ovocitos aptos de cada tamaño folicular fueron cultivados en grupos de 10 por gota y llevados a la maduración a 38 °C, 5% de CO₂, y 90% de humedad relativa por 24 horas.

4.4.5 Evaluación morfológica del ovocito

Los ovocitos fueron retirados de la cámara de incubación y observados en un estereoscopio, se observó los grados de maduración que tuvieron cada ovocito, clasificándolas en Grado 1: poco o nada de expansión de cúmulo; Grado 2: expansión moderada de las capas del cúmulo; Grado 3: expansión de todas las capas del cúmulo, este último grado se considera que el ovocito llegó a madurar completamente.



4.5 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó utilizando InfoStat (versión estudiantil 2020) (114). Bajo modelo diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para ovocitos recuperados, considerando como variable independiente el tamaño folicular, como variables de respuesta los ovocitos recuperados por ovario, viables por ovario, calidad A, B y C; mientras para el ANOVA del grado de expansión 1, 2 y 3, las variables de respuesta fueron tamaño folicular y concentraciones de hCG. Los datos, al inicio del análisis, se comprobaron la normalidad con la Prueba de Shapiro Wilk, la homogeneidad de varianza con la Prueba de Levene, se muestran en el anexo 6, para este último los datos de grado de expansión 1, 2 y 3 se transformaron a valores angulares, se muestran en el anexo 11. Para comparar las medias se usó la prueba de Bonferroni. Se consideró significativo a $P \leq 0,05$.

El modelo estadístico fue:

$$Y = \mu + F + C + FC + e$$

Donde:

Y = Promedio de grado de expansión del cumulo del ovocito de la vaca, ovocitos recuperados por ovario, viables por ovario, calidad A, B y C.

μ = Media general

F = Folículo de diferentes tamaños

C = Concentración de hCG

FC = Interacción de F por C

E = Error experimental

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Análisis de resultados

5.1.1 Ovocitos recuperados

Los resultados de ovocitos recuperados de vacas criollas se observan en la Tabla 4. El promedio de ovocitos recuperados por ovario entre los diferentes tamaños foliculares (≤ 2 mm y $>2-8$ mm) no presentó diferencia ($P>0.05$), tampoco hubo diferencia para ovocitos viables por ovario; así mismo para las diferentes calidades de ovocitos ($P>0.05$), se muestran en el anexo 4. Se recuperó 1.72 ± 0.57 ovocitos por ovario para folículos ≤ 2 mm; 2.15 ± 0.83 ovocitos por ovario para folículos $> 2-8$ mm. También se obtuvo 1.14 ± 0.60 ; 1.31 ± 0.15 ovocitos viables para folículos ≤ 2 mm y $> 2-8$ mm, respectivamente.

Tabla 4. Ovocitos (media \pm DE) recuperados según tamaño folicular de vacas criollas ($P \leq 0.05$)

Tamaño folicular	Ovarios n	Ovocitos recuperados					
		Total	Por ovario	Viables por ovario ¹	Calidad (%)		
					A	B	C
					Buena	Intermedia	Rechazada
≤ 2 mm	438	718	1.72 ± 0.57	1.14 ± 0.60	20.78 ± 5.94	$42.96 \pm 11,93$	36.26 ± 15.52
$> 2-8$ mm	456	930	2.15 ± 0.83	1.31 ± 0.15	21.82 ± 7.16	$39.52 \pm 8,89$	38.66 ± 11.27

¹ ovocitos de categoría A y B considerados aptos para maduración *in vitro*.

5.1.2 Expansión del cumulo del ovocito suplementado con diferentes concentraciones de gonadotropina coriónica humana (hCG)

Se muestran en la Tabla 5, los resultados del efecto de la hCG en la expansión del cúmulo del ovocito de vacas criollas. El tamaño folicular y la suplementación de hCG en la maduración *in vitro* no presentó interacción ($P>0.05$), se muestran en el anexo 7 para corroborar. Dada esta razón las variables se dividen e interpretadas por separado en tablas. Hubo diferencia entre suplementación de hCG versus grupo control en la expansión del cúmulo grado 3 ($P \leq 0.05$). Entre las concentraciones de hCG 5 y 15 UI/mL no presentaron diferencia ($P>0.05$), se muestran en el anexo 9.



Tabla 5. Promedio (media \pm DE) de grado de expansión del cúmulo de ovocitos con diferentes concentraciones de gonadotropina coriónica humana (hCG)

Grados de expansión hCG	Expansión del cúmulo (% \pm DE)		
	Concentración hCG (UI/mL)		
	0 (n = 306)	5 (n = 306)	15 (n = 289)
Grado 1	58.83 \pm 6.00 ^a	7.39 \pm 2.13 ^b	7.94 \pm 2.31 ^b
Grado 2	24.74 \pm 4.94 ^a	34.17 \pm 5.66 ^b	31.3 \pm 4.85 ^b
Grado 3	16.43 \pm 2.36 ^a	58.45 \pm 6.14 ^b	60.76 \pm 6.34 ^b

Letras con superíndice distintas dentro de la fila indican diferencia ($P \leq 0.05$)

Grado 1: poco o nada de expansión de cúmulo; Grado 2: expansión moderada de las capas del cúmulo; Grado 3: expansión de todas las capas del cúmulo

5.1.3 Expansión del cumulo de ovocito según tamaño folicular

Los resultados de la expansión de cúmulos (grado 3) del ovocito según tamaño folicular tabla 6. La expansión para el grado 3, no presentó diferencia ($P > 0.05$) entre ovocitos procedentes de folículos ≤ 2 y > 2 a 8 mm, para corroborar se muestra en el anexo 7. Siendo los promedios para folículos ≤ 2 mm $46.51 \pm 21.47\%$ y para folículos > 2 a 8 mm $44.96 \pm 21.62\%$.

Tabla 6. Promedio (media \pm DE) de grado de expansión del cúmulo de ovocitos según tamaño folicular, ($P > 0.05$).

Grado de expansión	Expansión del cúmulo (%)	
	Tamaño Folicular	
	≤ 2 mm (n)427	> 2 a 8 mm (n)474
Grado 1	23.88 \pm 25.11	24.61 \pm 24.79
Grado 2	29.61 \pm 6.12	30.43 \pm 6.66
Grado 3	46.51 \pm 21.47	44.96 \pm 21.62

Grado 1: poco o nada de expansión de cúmulo; Grado 2: expansión moderada de las capas del cúmulo; Grado 3: expansión de todas las capas del cúmulo

5.2 Discusión

En el presente estudio, el promedio total de ovocitos recuperados por ovario de folículos ≤ 2 mm fue 1.72 ± 0.57 y de folículos $> 2-8$ mm fue 2.15 ± 0.83 . Estos resultados son similares al estudio de Sulca (115), quien obtuvo un promedio de 1.85 ± 1.25 ovocitos recuperados por ovario. Mientras otros alcanzaron entre 4 a 5 ovocitos por ovario (62, 116), estos valores son superiores a los obtenidos en el presente estudio, probablemente se deba a que los autores tomaron muestras, cuando se usaba una dieta de pastoreo o basada en energía la cual refleja en un estado corporal deseable, y es por eso que la calidad y el número de ovocitos en el ganado son excelentes, como lo reporta (62), así reflejando los mecanismos reproductivos afectados como se muestra. Otro reporte por Gonzales (117), demostró que por aspiración folicular encontró 3.8 ovocitos por ovario, y 4.58 por (118), en vacas mestizas. Esta diferencia fundamentalmente se atribuiría al estado corporal del animal, dado que en el presente estudio los animales se encontraban en estado corporal bajo, otro factor que pudo afectar en estos resultados son el uso de biseles respecto al diámetro y tipo de bisel que las agujas tienen, deben guardar relación con el nivel de succión practicado. Los trabajos realizados por (82), consideran el éxito de colección de ovocitos. Otro factor se debe a la morfología del ovario (119) y otros factores externos.

Los resultados de la expansión de las células del cúmulo del ovocito en el presente estudio es la siguiente $60.76 \pm 6.34\%$ del grado 3 que indica la maduración óptima, que son similares a los reportes de Rizo (24), quien usó hCG de 10 UI/mL, encontrando 62% de ovocitos madurados en *Bos indicus*. Los ovocitos de las cebuinas tienen mejor maduración respecto a *Bos taurus* (120). Otro reporte por Nguyen *et al.* (46) alcanzaron resultados similares de 51.2 ± 2.7 y $52.7 \pm 2.7\%$ de maduración del ovocito utilizando concentraciones de hCG 5 y 15 UI/mL. En otros estudios, Vásquez-Araque (23) obtuvo 40.8 y 88.4% de expansión total de cúmulos, utilizando 10 UI/mL de LH, uno de los resultados es mayor al presente estudio, esta diferencia se atribuiría a la pre incubación por 6 h realizada en dicho estudio; por otra parte, el otro resultado que obtuvo es inferior a nuestro resultado. Por otro lado, Carrillo *et al.* (22) obtuvieron alrededor de 81.12% de expansión de grado 3 del cúmulo de ovocitos, con suplementación de 5 UI/mL de LH durante la maduración *in vitro*. Los resultados obtenidos en la expansión del cúmulo del grado 3 que es la máxima en maduración *in vitro*, se evidencia que para los diferentes tamaños foliculares no hay diferencia significativa, siendo el promedio $46.51 \pm 21.47\%$ para folículos de ≤ 2 mm, y 44.96 ± 21.62 para folículos > 2 a 8 mm. Segura (37) considerando los tamaños foliculares de 1-2 y 3-4 mm, llegó a obtener 89 y 85% de ovocitos madurados, en consecuencia los

diferentes tamaños foliculares poseen similar maduración. Así mismo, Ayala *et al.* (44), indican que los tamaños foliculares menores a 4 mm llegaron a 74.9% de maduración, mientras los folículos de 4-8 mm alcanzaron 75% de maduración. Otro reporte por Castro (47), demostró que folículos grandes (2-8 mm), y pequeños (<2 mm), tras la MIV no se observaron diferencias significativas en la tasa de metafase II (18.1% vs 22.1%) de ovocitos, además Muasa *et al.* (45) reportaron que folículos de 1-3 mm de diámetro son capaces de producir ovocitos competentes en el desarrollo.



CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

El tamaño folicular no influyó en promedio de ovocitos recuperados por ovario ni ovocitos viables para maduración *in vitro* de ovocitos de vacas criollas.

No hubo interacción entre el tamaño folicular y la concentración de hCG en la maduración *in vitro* de ovocitos de vacas criollas.

Las concentraciones de hCG 5 UI/mL fue suficiente para la expansión del cúmulo de ovocitos, la misma que no fue influida por el tamaño folicular durante la maduración *in vitro* de ovocitos de vacas criollas.

6.2 Recomendaciones

Realizar investigaciones con variables de estudio relacionado con tamaños foliculares.

Evaluar la maduración *in vitro* de vacunos criollos con diferentes parámetros de evaluación.

Determinar calidad, cantidad, ovocitaria de vacunos criollos de baja condición corporal

Realizar investigaciones de maduración *in vitro* de ovocitos con vacas criollas de condición corporal 3.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Food and agriculture organization of the united nations (FAO). The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome: B.D. Scherf y D. Pilling; 2015.
2. Rivas E, Veli E, Aquino Y, Rivas V, Pastor S, Estrada R. Acciones para la caracterización y conservación del bovino criollo Peruano (*Bos taurus*). Anim Genet Resour Inf. 2007;40:33-42.
3. Coaquira-Quispe JE. El bovino criollo del altiplano peruano. Origen, producción y perspectivas. Rev Invest Altoandino. 2016;18(3):3-257.
4. Flores F, Quispe S, Mallma Y. caracterización morfológica , morfoestructural y faneróptica del bovino criollo (*Bos taurus*) de apurímac- Perú. Actas Iberoam Conserv Anim. 2020;15:18-22.
5. Garcia-Cuipa G. Condición corporal y calidad de la piel de vacunos (*Bos taurus*) criollos faenados en el camal municipal de abancay tesis. Universidad nacional micaela bastidas de apurímac; 2019.
6. Pereira JAC. Conservación de ganado bovino criollo en Santa Cruz , Bolivia Conservation of creole cattle in Santa Cruz , Bolivia. Lat Am Arch Anim Prod. 2018;26(1-2):28-31.
7. Eufemia L, Morales H, Bonatti M, Graser M, Lana M, Sieber S. Collective Perception of anthropic and extractive interventions in the Colombian Llanos. Soc Sci. 2019;8(259):1-15.
8. Yalta-Macedo CE, Veli EA, Díaz GR, Vallejo-Trujillo A. Paternal ancestry of Peruvian creole cattle inferred from Y-chromosome analysis. Livest Sci [Internet]. febrero de 2021;244:104376.
9. Bolaji UFO, Ajasa AA, Ahmed RO, Bello SF, Ositanwosu OE. Cattle Conservation in the 21st Century. Open J Anim Sci. 2021;11(02):304-32.
10. Ealy AD, Wooldridge LK, Mccoski SR. Board invited review: Post-transfer consequences of *in vitro*-produced embryos in cattle. J Anim Sci. 2019;97(6):2555-68.
11. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). INIA instalará núcleo genético regional de ganado vacuno en Apurímac - Noticias - Instituto Nacional de Innovación Agraria - Gobierno del Perú [Internet]. 2021 [citado 12 de octubre de 2022].
12. Ferré LB, Kjelland ME, Strobech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. The Animal Consortium. 2020;14(5):991-1004.



13. Irving-Rodgers HF, Morris S, Collett RA, Peura TT, Davy M, Thompson JG, et al. Phenotypes of the ovarian follicular basal lamina predict developmental competence of oocytes. *Hum Reprod.* 2009;24(4):936-44.
14. Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology.* 2002;57(5):1523-32.
15. Dalton CM, Szabadkai G, Carroll J. Measurement of ATP in single oocytes: Impact of maturation and cumulus cells on levels and consumption. *J Cell Physiol.* 2014;229(3):353-61.
16. Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol.* 1994;164(1):1-9.
17. Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *Am Soc Anim Sci.* 2004;82:14-23.
18. Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev.* 1992;31(1):63-7.
19. Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P. Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *J Reprod fertility.* 1996;109:335-65.
20. Zuelke K., Brackett B. uteinizing hormone_enhanced *in vitro* maturation of bovine oocyte with and without protein supplementation. *Biol Reprod.* 1990;43:784-7.
21. Del Campo MR, Del Campo CH, Donoso MX, Berland M, Mapletoft RJ. *In vitro* fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology.* 1994;41(6):1219-29.
22. Carrillo-Gonzalez DF, Hernández Herrera DY, Vásquez Araque NA. Evaluación del YM976 como alternativo a las hormonas gonadotrópicas en la maduración *in vitro* de oocitos bovinos y su competencia para el desarrollo embrionario. *Rev Investig Vet del Perú.* 2021;32(6):e20341.
23. Vásquez Araque N, Chavarría NA, Ceballos CP, Restrepo Betancur G. Efecto de la preincubación sobre la mucificación y la maduración nuclear de oocitos bovinos cultivados *in vitro*. *Rev Politécnica.* 2008;4(6):53-64.
24. Rizo-González AM. Evaluación de cinco suplementos utilizados para la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. Universidad de Guadalajara; 1993.
25. Sarwar Z, Saad M, Saleem M, Husnain A, Riaz A, Ahmad N. Effect of follicle size on oocytes recovery rate, quality, and in-vitro developmental competence in *Bos indicus*



- cows. Anim Reprod. 2020;17(3):1-9.
26. García HP, Quintela AL, Becerra GJ, Peña MA. Aplicaciones de los embriones bovinos producidos «*in vitro*» - [Internet]. Dialnet. 2016 [citado 19 de julio de 2022]. p. 20-2.
 27. Frías Sánchez Z, Pantoja Garrido M, Sánchez Martín F. Desencadenantes de la maduración ovocitaria en ciclos de fecundación *in vitro*. Rev Cuba Obstet y Ginecol. 2017;43(2):1-11.
 28. Reyes SM de los. Fecundación *in vitro* en bovinos: Avances en el manejo de gamentos. Avances en Ciencias Veterinarias. Ciencias Vet [Internet]. 1994 [citado 19 de julio de 2022];9(1).
 29. Motlík J, Fulka J. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. Theriogenology. 1986;25(1):87-96.
 30. Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Mol Reprod Dev. 1995;41(1):54-62.
 31. Segura PG. 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.
 32. Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S. Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation. Hum Reprod. 2000;15(SUPPL. 5):11-7.
 33. Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J. Oocyte maturation and embryonic failure. Hum Reprod Update. 1998;4(3):223-36.
 34. Aguila L, Treulen F, Therrien J, Felmer R, Valdivia M, Smith LC. Oocyte selection for *in vitro* embryo production in bovine species: Noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. Animals. 2020;10(12):1-24.
 35. Brem G. Aplicaciones de la producción *in vitro* de embriones. In: Biotecnología de la reproducción [Internet]. Biotecnología de la reproducción. 1993. p. 250-6.
 36. Castel J. Desarrollan ganado criollo resistente al cambio climático. la Razon [Internet]. 2018 [citado 21 de julio de 2022];
 37. Segura G. Capacidad de maduración *in vitro* de ovocitos obtenidos de folículos de tres tamaños diferentes en bovinos. Spermova. 2015;5(1):106-9.
 38. Gonella A, Atuesta J, Bernal S, Chacón L. Overview of the production of bovine embryos *in vitro*. Investig Agrar y Ambient [Internet]. 2013;4(1):65-80.
 39. Palma GA. Biotecnología de la reproducción. En: Gene. 1997. p. 1-19.
 40. Plancha CE, Albertini DF. Hormonal regulation of meiotic maturation in the hamster oocyte involves a cytoskeleton-mediated process. Biol Reprod. 1994;51(5):852-64.
 41. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: Structure and function. Annu Rev Biochem. 1981;Vol. 50:465-95.



42. Abbara A, Clarke SA, Dhillon WS. Novel concepts for inducing final oocyte maturation in *in vitro* fertilization treatment. *Endocrine Reviews*. 2018;39(5):593-628.
43. Murphy B, Martinuk S. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev*. 1991;12(1):27-44.
44. Ayala LG, Palacios TC, Nieto PE, Calle G, Rodas R, Dutan JM, et al. Capacidad de reinicio de la meiosis de ovocitos provenientes de folículos de varios tamaños obtenidos de ovarios de camal Competence. *Rev Inv Vet Perú*. 2019;30(3):1164-74.
45. Muasa B, Mutembei H, Tsuma V, Camargo L, Viana J, Okeyo M. Effect of Follicle Size of Boran Cows on Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase Activity and Developmental Competence. *Inter J Vet Sci*. 2015;4(4):161-5.
46. Nguyen NT, Nhu TTB. Effect of human chorionic gonadotropin on the meiotic resumption of bovine oocyte *in vitro*. *J Anim Husb Sci Tech*. 2021;268(268):74-8.
47. Castro-Modesto T, Mamani P, Pella R, Bravo Z, Villarreal-Ugarte S, Cancho C, et al. Effect of follicle size on *in vitro* maturation in alpaca oocytes (*Vicugna pacos*) and the first ICSI in alpaca species. *Small Rumin Res* [Internet]. 1 de agosto de 2022 [citado 19 de julio de 2022];213:106680.
48. More MM. Caracterización faneróptica y morfométrica del vacuno criollo en Ayacucho, Puno y Cajamarca [Internet]. Universidad Nacional Agraria la Molina; 2016 [citado 23 de julio de 2022].
49. Bonsma JC. Estudios sobre selección del ganado Wortham [Internet]. 1976 [citado 23 de julio de 2022]. 132 p.
50. Rangel L, Hernández JH. Fisiología reproductiva de los animales domésticos [Internet]. 2018 [citado 23 de julio de 2022]. 540 p.
51. Sequeira L. Compendio sobre reproducción animal [Internet]. Vol. Vol. 1, Centro Nacional de Información y Documentación Agropecuaria. 2013. 108 p.
52. Stalfors H. . Stalfors H. Gestation and sterility in cows. *Monatshefte für Prakt Tierheilkd* [Internet]. 1916 [citado 11 de octubre de 2022];338:27.
53. Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2011;124(3-4):163-9.
54. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* [Internet]. 7 de enero de 2006 [citado 8 de octubre de 2022];65(1):126-36
55. Rodríguez Zamora LA. Optimización del método de recuperación de ovocitos para la fecundación *in vitro* [Internet]. Universidad de Santiago de Compostela. 2013.
56. Pfeifer LFM, Schneider A, Corrêa MN. Factors that affect the *in vitro* production of bovine embryos: A review. *Rev Colomb Ciencias Pecu*. 2008;21(1):109-20.
57. Merton JS, De Roos APW, Mullaart E, De Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, et al. Factors



- affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 2003;59(2):651-74.
58. Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvão KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci*. 2004;82-83:513-35.
59. Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod*. 2005;73(1):54-62.
60. Palma GA, Tortonese DJ, Sinowatz F. Developmental capacity *in vitro* of prepubertal oocytes. *Anat Histol Embryol*. 2001;30(5):295-300.
61. Nagai T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*. 2001;55(6):1291-301.
62. Tinco-Salcedo J, Quispe-Gutiérrez U, Zea-Gonzales D. Asociación entre calidad de ovocitos recuperados y condición corporal en vacas criollas. *Rev Investig Altoandinas - J High Andean Res*. 2021;23(3):133-8.
63. Bezdíček J, Nesvadbová A, Makarevich A, Kubovičová E. Relationship between the animal body condition and reproduction: The biotechnological aspects. *Arch Anim Breed*. 2020;63(1):203-9.
64. Lukuyu B, Gachuri CK, Lukuyu MN, Lusweti C, Mwendia S. Feeding dairy cattle in East Africa. *Feed dairy cattle East Africa*. 2012.
65. Zarco L. Endocrinología de la reproducción. In: Galina C, Valencia J E, editor. *Reproducción de animales domésticos*. Ciudad de México. Limusa; 2008.
66. Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod*. 1994;50(2):233-8.
67. Abramovich D, Irusta G, Parborell M. Foliculogénesis [Internet]. 2014 [citado 23 de julio de 2022].
68. Zarco L. Gametogénesis In: Rangel L, Hernández Medrano JH, *Fisiología reproductiva de los animales domésticos*. [Internet]. [Ciudad de México]: Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad; 2018 [citado 11 de octubre de 2022].
69. Nilsson E, Skinner MK. Interacciones celulares que controlan el desarrollo del folículo primordial y la foliculogénesis. *D la Soc para la Investig Ginecológica* [Internet]. 1 de enero de 2001 [citado 11 de octubre de 2022];8(1_suppl):S17-20.
70. Fortune JE. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*. 2003;78(3-4):135-63.

71. Filipiak Y, Viqueira M, Bielli A. Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *SMVU*. 2016;52(202):14-22.
72. Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*. 1994;50(2):225-32.
73. Gilbert SF. *Gilbert Biología del desarrollo* [Internet]. 7ª. 2005 [citado 23 de julio de 2022]. 882 p.
74. Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, De Kruif A. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod Domest Anim*. 2002;37(3):144-51.
75. Adams EC, Hertig a T. Studies on Guinea Pig Oocytes. I. Electron Microscopic Observations on the Development of Cytoplasmic Organelles in Oocytes of Primordial and Primary Follicles. *J Cell Biol*. 1964;21:397-427.
76. OMS. *Química y fisiología de los gametos* [Internet]. Organización Mundial De La Salud Serie De Informes Tecnicos. 1966. p. 12.
77. Moore KL, Persaud TVN, Torchia M. *Embriología Clínica* [Internet]. (novena ed. 2013 [citado 24 de julio de 2022]). 33 p.
78. Mermillod P, Oussaid B CY. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil* [Internet]. 1999 [citado 24 de julio de 2022];54:449-60.
79. Saladin KS, Pineda Rojas E. *Anatomía y fisiología la unidad entre forma y función*. 2013.
80. Dasí Crespo R, Descals Ferrando J, Moreno-Moya JM, Olmedo Illueca C, Martínez Rodero I, Cuevas Saiz I. Vitricación de Espermatozoides. *Asebir*. 2016;21(1):16-8.
81. Albarracín Monje JL, Mogas Amorós T. Vitricación de ovocitos bovinos mediante la técnica Open Pulled Straw [Internet]. 2005.
82. Bols PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, Vandenhede JMM, De Kruif A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1996;45(5):1001-14.
83. Crocomo L, Marques Filho W, Landim Alvarenga F, Bicudo S. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção *in vitro* de embriões ovinos. *Rev Bras Reprodução Anim*. 2012;36(1):25-31.
84. Herradón P, Quintela L, Becerra J, Ruibal S, Fernandez M. Fecundación *in vitro*: Alternativa para la mejora genética en bovinos. *Dep Patol Anim*. 2007;15(1):34-42.
85. Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*. 1994;41(8):1571-83.
86. Tur R, Martínez F, Arroyo G, Carreras O, Belil I, Coroleu B, et al. Estado actual de la



- maduración *in vitro* (MIV). *Serv Med la Reprod.* 2007;24(2):113-21.
87. Lasiene K, Lasys V, Glinskyte S, Valanciute A, Vitkus A. Relevance and Methodology for the Morphological Analysis of Oocyte Quality in IVF and ICSI. *J Reprod Stem Cell Biotechnol.* 2011;2(1):1-13.
88. Satrio FA, Karja NW, Setiadi MA, Kaiin EM, Gunawan M, Memili E, et al. Improved Maturation Rate of Bovine Oocytes Following Sericin Supplementation in Collection and Maturation Media. *Trop Anim Sci J.* 2022;45(1):24-9.
89. Baishya D, Bora A, Baruah A, Dutta D, Barman C, Tamuly S. Effect of insulin-like growth factor-I on *in vitro* maturation, fertilization and early embryonic development of cattle oocytes. *J Entomol Zool Stud.* 2021;9(1):1924-9.
90. Wei Y, Idrees M, Sidrat T, Joo M, Xu L, Ko J, et al. Boec-Exo Addition Promotes *In vitro* Maturation of Bovine Oocyte and Enhances the Developmental Competence of Early Embryos. *Animals.* 2022;12:424.
91. De Loos F, van Beneden T, Kruip TAM, Van-Maurik P. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev.* 1992;31(3):208-14.
92. Lorenzo-González PL. “Maduraclon *in vitro* de oocitos de ganado vacuno”. 1992.
93. Veeck LL. Oocyte Assessment and Biological Performance. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;541(1):259-74.
94. Jaffe R. The endocrinology of pregnancy. En: Yen SSC, Jaffe RB, editores. *Reproductive Endocrinology. Physiology, pathophysiology and clinical management.* Filadelfia: W.B Saunders co.; 1978. p. 521-36.
95. Salgado R, Vergara Ó, Ramírez L. Effect of gonadotropins on the maturation and embryo development of bovine oocytes cultured *in vitro*. *Rev MVZ Córdoba.* 2010;15(1):1954-60.
96. Young G, Kagawa H, Nagahama Y. Evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulosa cells of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) associated with final oocyte maturation. *Biol Reprod.* 1983;29(2):310-5.
97. Nagahama Y. $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation inducing hormone in fish oocytes [Internet]. Vol. 62, mechanisms of synthesis and action Steroids. 1997 [citado 8 de noviembre de 2022]. p. 190-6.
98. Quispe GUS, Huanca MT, Olivera MV. Influencia de las hormonas folículo estimulante, luteinizante y gonadotropina coriónica equina en la maduración *in vitro* de ovocitos y clivaje de embriones de alpaca influence. *Rev Investig la Esc Posgrado.* 2019;8(1):974-85.
99. Ramos MES. Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de (*Vicugna pacos*)alpaca Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2009.
100. Lopez LO. Endocrinología Reproductiva [Internet]. slideshare. 2014 [citado 11 de



- noviembre de 2022]. p. 1-16.
101. Cole LA. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:1-14.
 102. De Rensis F, López-Gatius F. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: A review. *Reprod Domest Anim [Internet]*. abril de 2014 [citado 11 de noviembre de 2022];49(2):177-82.
 103. Wei SC, Gong ZD, Zhao HW, Liang HQ, Lai LJ, Deng YY. Equine chorionic gonadotropin influence on sheep oocyte *in vitro* maturation, apoptosis, and follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor expression. *Genet Mol Res*. 2016;15(4):1-13.
 104. Santos JA, Freitas BG, Guerreiro BM, Souza, Evandro Davanço Ferreira; Rocha F, Fainer L, Braga YEV da S, et al. Efficiency of the protocol of cyclicity induction with injectable progesterone in prepubertal 2-year-old Nelore (*Bos indicus*) Heifers. En: *Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)*. 2019. p. 555.
 105. Ho VNA, Pham TD, Le AH, Ho TM, Vuong LN. Live birth rate after human chorionic gonadotropin priming *in vitro* maturation in women with polycystic ovary syndrome. *J Ovarian Res*. 2018;11(1):1-11.
 106. Hafez ESE, Hafez B. *Reproducción e Inseminación Artificial en animales*. 4a. ed. Hafez ESE, Hafez B, editores. Séptima Edición. McGraw-Hill. México: McGraw-Hill Interamericana; 2000. p. 40-4.
 107. Guzmán L. Maduración *in vitro* de ovocitos: una alternativa en técnicas de reproducción asistida. *Rev Peru Ginecol y Obstet*. 2015;57(1):13-7.
 108. Motta-Delgado PA, Ramos-Cuéllar N, González-Sánchez CM, Rojas-Castro EC. Follicular dynamics in the reproductive life of female livestock. *Vet y Zootec*. 2011;5(2):88-99.
 109. Ginther O., Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil*. 1989;87:223-30.
 110. Hernández BG. Un recurso genético valioso: La raza Casanare. En: *Mejoramiento Genético para la Ganadería Colombiana [Internet]*. Produmedios, Bogotá, DC. 2003 [citado 26 de julio de 2022]. p. 75-8.
 111. Dejarnette M. *Anatomía y Fisiología de la Reproducción Bovina*. 2008. 1-6 p.
 112. Supo J, Seminarios de Investigación. *Seminarios de Investigación Científica Sinopsis del libro 2012 [Internet]*. Seminarios de Investigación Científica. 2012.
 113. Google M. *Coordenadas de ubicación*. En *lín*. 2022-05-31; 2022.



114. Infostat. Software Estadístico Versión 2020. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2020.
115. Sulca-Ñaupas LV. Viabilidad post descongelación de ovocitos en bovinos criollos según diámetro folicular Ayacucho 2750 m.s.n.m-2016. Universidad Nacional de San Cristóbal De Huamanga; 2017.
116. Gomez O, Alva G, Huillcas F, Salinas D. Técnicas del slicing y aspiración folicular en la eficiencia de la recuperación de ovocitos bovinos criollos post-mortem en el camal. Spermova. 2012;2(1):38-9.
117. González, R., Soto Beloso, E., Delgado, N., Portillo, G., De Ondiz, A. y Carlos Velarde J. Comparación de dos metodos de recolección de oocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados. Rev científica fev luz. 1992;2(2).
118. Hernández-Fernández A, Nava-Trujillo H, Vílchez V. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración *in vitro*. Prod Agropecu Sanid Anima [Internet]. 2010 [citado 26 de julio de 2022];3(1).
119. Gandolfi F, Pocar P, Luciano AM, Rieger D. Effects of EGF and IGF-1 during in-vitro maturation of cattle oocytes on subsequent embryo development and metabolism. Theriogenology. enero de 1996;45(1):277.
120. Contreras B, Francisco J, Corona C, Adeymi C, Fonseca H, Hugo J, et al. Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. Rev Científ FCVLUZ. 2010;XX(3):259-67.

ANEXOS



Anexo 1. Base de datos de la colección de ovocitos

Tabla 7. Base de datos de la colección de ovocitos por medio de la técnica de aspiración folicular

REP	CONC	FOL	A	B	C	A: B: C	A: B	OVA	A %	B%	C%
1	0	MEN	14	39	12	65	53	22	21.54	60.00	18.46
2	0	MEN	13	31	11	55	44	32	23.64	56.36	20.00
3	0	MEN	7	17	9	33	24	16	21.21	51.52	27.27
4	0	MEN	9	14	15	38	23	28	23.68	36.84	39.47
1	0	MAY	16	15	23	54	31	22	29.63	27.78	42.59
2	0	MAY	13	39	15	67	52	32	19.40	58.21	22.39
3	0	MAY	9	18	9	36	27	16	25.00	50.00	25.00
4	0	MAY	7	16	15	38	23	28	18.42	42.11	39.47
5	0	MAY	11	23	31	65	34	39	16.92	35.38	47.69
6	0	MAY	5	12	24	41	17	14	12.20	29.27	58.54
1	5	MEN	15	35	6	56	50	22	26.79	62.50	10.71
2	5	MEN	8	19	14	41	27	36	19.51	46.34	34.15
3	5	MEN	10	26	18	54	36	19	18.52	48.15	33.33
4	5	MEN	11	23	19	53	34	32	20.75	43.40	35.85
1	5	MAY	16	25	10	51	41	22	31.37	49.02	19.61
2	5	MAY	9	28	32	69	37	36	13.04	40.58	46.38
3	5	MAY	14	29	13	56	43	19	25.00	51.79	23.21
4	5	MAY	10	19	22	51	29	32	19.61	37.25	43.14
5	5	MAY	9	11	13	33	20	28	27.27	33.33	39.39
6	5	MAY	4	13	14	31	17	18	12.90	41.94	45.16
1	15	MEN	6	18	34	58	24	39	10.34	31.03	58.62
2	15	MEN	7	10	7	24	17	18	29.17	41.67	29.17
3	15	MEN	10	10	22	42	20	34	23.81	23.81	52.38
4	15	MEN	13	19	18	50	32	37	26.00	38.00	36.00
5	15	MEN	10	16	10	36	26	22	27.78	44.44	27.78
6	15	MEN	5	10	32	47	15	35	10.64	21.28	68.09
7	15	MEN	7	19	13	39	26	28	17.95	48.72	33.33
8	15	MEN	3	9	15	27	12	18	11.11	33.33	55.56
1	15	MAY	21	25	43	89	46	39	23.60	28.09	48.31
2	15	MAY	15	32	36	83	47	18	18.07	38.55	43.37
3	15	MAY	11	32	36	79	43	34	13.92	40.51	45.57
4	15	MAY	17	17	25	59	34	37	28.81	28.81	42.37
5	15	MAY	10	11	7	28	21	22	35.71	39.29	25.00

- A: cantidad de ovocitos de categoría A
- B: cantidad de ovocitos de categoría B
- C: cantidad de ovocitos de categoría C
- A-B-C: cantidad total de ovocitos de las diferentes categorías
- A-B: cantidad total de ovocitos viables para maduración *in vitro*
- FOL: tamaño folicular
- MAY: folículos mayores
- MEN: folículos menores
- CONC: concentraciones de hCG (UI/mL)
- REP: repeticiones

Anexo 2. Pruebas de normalidad y homogeneidad

Tabla 8. Prueba de Shapiro-Wilks para normalidad de datos de ovocitos recuperados.**Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
RDUO A %	33	0.00	6.49	0.94	0.2019
RDUO B%	33	0.00	10.31	0.96	0.6290
RDUO C%	33	0.00	13.28	0.97	0.7369

Tabla 9. Pruebas de Levene para homogeneidad de varianza de ovocitos recuperado según tamaño folicular.**RABS A %**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19.14	1	19.14	1.56	0.2210
FOL	19.14	1	19.14	1.56	0.2210
Error	380.23	31	12.27		
Total	399.36	32			

RABS B%

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	52.63	1	52.63	1.35	0.2545
FOL	52.63	1	52.63	1.35	0.2545
Error	1210.53	31	39.05		
Total	1263.16	32			

RABS C%

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	48.12	1	48.12	0.72	0.4011
FOL	48.12	1	48.12	0.72	0.4011
Error	2058.04	31	66.39		
Total	2106.15	32			

Anexo 3. Medidas estadísticas de resumen

Tabla 10. Medidas estadísticas de resumen de la (Media \pm Desviación estándar) de ovocitos colectados.

Medidas resumen

FOL	Variable	n	Media	D.E.	E.E.
MAY	A %	17	21.82	7.15	1.74
MAY	B%	17	39.52	8.89	2.16
MAY	C%	17	38.66	11.27	2.73
MEN	A %	16	20.78	5.94	1.49
MEN	B%	16	42.96	11.93	2.98
MEN	C%	16	36.26	15.52	3.88

MAY: folículos mayores

MEN: folículos menores

Anexo 4. Análisis de varianza para categorías de ovocitos

Tabla 11. ANOVA para las diferentes categorías de ovocitos colectados según tamaño folicular.

Categoría A %

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8.89	1	8.89	0.20	0.6544
FOL	8.89	1	8.89	0.20	0.6544
Error	1348.41	31	43.50		
Total	1357.30	32			

Categoría B%

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	97.41	1	97.41	0.89	0.3532
FOL	97.41	1	97.41	0.89	0.3532
Error	3398.91	31	109.64		
Total	3496.32	32			

Categoría C%

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	47.38	1	47.38	0.26	0.6136
FOL	47.38	1	47.38	0.26	0.6136
Error	5646.29	31	182.14		
Total	5693.67	32			



Anexo 5. Base de datos de la maduración *in vitro* de ovocitos**Tabla 12.** Base de datos de la maduración *in vitro* de ovocitos por expansión de los cúmulos.

Datos del grado de maduración por expansión del cúmulo									
REP	CONC	FOL	G1	G2	G3	FOL	Transformados a %		
							G1	G2	G3
1	0	MEN	32	10	6	MEN	66.67	20.83	12.50
2	0	MEN	19	6	5	MEN	63.33	20.00	16.67
3	0	MEN	11	6	3	MEN	55.00	30.00	15.00
4	0	MEN	6	3	2	MEN	54.55	27.27	18.18
5	0	MEN	20	6	4	MEN	66.67	20.00	13.33
1	0	MAY	14	9	5	MAY	50.00	32.14	17.86
2	0	MAY	32	13	9	MAY	59.26	24.07	16.67
3	0	MAY	15	4	4	MAY	65.22	17.39	17.39
4	0	MAY	10	5	4	MAY	52.63	26.32	21.05
5	0	MAY	18	7	5	MAY	60.00	23.33	16.67
5	0	MAY	7	4	2	MAY	53.85	30.77	15.38
1	5	MEN	5	16	25	MEN	10.87	34.78	54.35
2	5	MEN	2	8	13	MEN	8.70	34.78	56.52
3	5	MEN	2	13	17	MEN	6.25	40.63	53.13
4	5	MEN	2	8	20	MEN	6.67	26.67	66.67
1	5	MAY	3	11	23	MAY	8.11	29.73	62.16
2	5	MAY	1	11	20	MAY	3.13	34.38	62.50
3	5	MAY	3	18	18	MAY	7.69	46.15	46.15
4	5	MAY	2	9	19	MAY	6.67	30.00	63.33
5	5	MAY	1	5	10	MAY	6.25	31.25	62.50
6	5	MAY	2	7	12	MAY	9.52	33.33	57.14
1	15	MEN	1	6	13	MEN	5.00	30.00	65.00
2	15	MEN	1	4	8	MEN	7.69	30.77	61.54
3	15	MEN	3	11	31	MEN	6.67	24.44	68.89
4	15	MEN	2	9	17	MEN	7.14	32.14	60.71
5	15	MEN	1	3	6	MEN	10.00	30.00	60.00
6	15	MEN	1	3	7	MEN	9.09	27.27	63.64
7	15	MEN	2	8	12	MEN	9.09	36.36	54.55
8	15	MEN	1	3	4	MEN	12.50	37.50	50.00
1	15	MAY	3	16	23	MAY	7.14	38.10	54.76
2	15	MAY	1	7	20	MAY	3.57	25.00	71.43
3	15	MAY	2	8	11	MAY	9.52	38.10	52.38
4	15	MAY	2	9	19	MAY	6.67	30.00	63.33
5	15	MAY	1	3	7	MAY	9.09	27.27	63.64

FOL:	tamaño folicular
MAY:	foliculos mayores
MEN:	foliculos menores
CONC:	concentraciones de hCG (UI/mL)
REP:	repeticiones
G1:	Grado 1: poco o nada de expansión de cúmulo
G2:	Grado 2: expansión moderada de las capas del cúmulo
G3:	Grado 3: expansión de todas las capas del cúmulo (ovocito madurado)



Anexo 6. Pruebas de normalidad y homogeneidad para grados de expansión del cúmulo
Tabla 13. Prueba de Shapiro-Wilks para normalidad datos de los grados de expansión del cúmulo.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
RDUO G1	34	0.00	3.58	0.97	0.7735
RDUO G2	34	0.00	4.95	0.93	0.1020
RDUO G3	34	0.00	5.11	0.96	0.5486

Tabla 14. Prueba de Levene para homogeneidad de varianza de los grados de expansión del cúmulo.

RABS G1

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.6E-03	3	8.5E-04	1.61	0.2077
CONC	2.6E-03	2	1.3E-03	2.41	0.1066
FOL	1.5E-05	1	1.5E-05	0.03	0.8671
Error	0.02	30	5.3E-04		
Total	0.02	33			

RABS G2

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8.6E-04	3	2.9E-04	0.29	0.8298
CONC	1.9E-04	2	9.3E-05	0.10	0.9090
FOL	6.2E-04	1	6.2E-04	0.64	0.4308
Error	0.03	30	9.8E-04		
Total	0.03	33			

RABS G3

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.01	3	1.8E-03	1.54	0.2234
CONC	0.01	2	2.6E-03	2.31	0.1171
FOL	1.3E-04	1	1.3E-04	0.11	0.7430
Error	0.03	30	1.1E-03		
Total	0.04	33			



Anexo 7. Análisis de varianza para grados de expansión del cúmulo

Tabla 15. ANOVA para grados de maduración, según concentración, tamaño folicular e interacción.

G1:

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19511.09	5	3902.22	270.23	<0.0001
CONC	19202.58	2	9601.29	664.89	<0.0001
FOL	42.63	1	42.63	2.95	0.0968
CONC*FOL	18.66	2	9.33	0.65	0.5317
Error	404.33	28	14.44		
Total	19915.42	33			

G2:

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	514.38	5	102.88	3.59	0.0124
CONC	504.80	2	252.40	8.80	0.0011
FOL	6.14	1	6.14	0.21	0.6471
CONC*FOL	6.08	2	3.04	0.11	0.8998
Error	802.94	28	28.68		
Total	1317.33	33			

G3:

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	14000.97	5	2800.19	91.45	<0.0001
CONC	13737.53	2	6868.77	224.33	<0.0001
FOL	16.57	1	16.57	0.54	0.4681
CONC*FOL	4.80	2	2.40	0.08	0.9248
Error	857.32	28	30.62		
Total	14858.30	33			

Anexo 8. Medida de estadísticas de resumen para concentraciones de hCG

Tabla 16. Medidas estadísticas de resumen de la (Media ± Desviación estándar) de la concentración de hCG

CONC	Variable	n	Media	D.E.	E.E.
0	G1	11	58.83	6.00	1.81
0	G2	11	24.74	4.94	1.49
0	G3	11	16.43	2.36	0.71
5	G1	10	7.39	2.13	0.67
5	G2	10	34.17	5.66	1.79
5	G3	10	58.45	6.14	1.94
15	G1	13	7.94	2.31	0.64
15	G2	13	31.30	4.85	1.34
15	G3	13	60.76	6.34	1.76

CONC: concentraciones de hCG (UI/mL)

G1: Grado 1: poco o nada de expansión de cúmulo

G2: Grado 2: expansión moderada de las capas del cúmulo

G3: Grado 3: expansión de todas las capas del cúmulo (ovocito madurado)



Anexo 9. Análisis de varianza y prueba de comparación múltiple a través de test de Bonferroni para concentraciones de hCG

Tabla 17. ANOVA y pruebas de comparación múltiple para la variable concentración hCG

G1

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19460.78	2	9730.39	649.63	<0.0001
CONC	19460.78	2	9730.39	649.63	<0.0001
Error	464.33	31	14.98		
Total	19925.11	33			

Test: Bonferroni Alfa=0.05 DMS=4.13901

Error: 14.9783 gl: 31

CONC	Medias	n	E.E.	
0	58.83	11	1.17	A
15	7.94	13	1.07	B
5	7.39	10	1.22	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

G2

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	500.53	2	250.26	9.52	0.0006
CONC	500.53	2	250.26	9.52	0.0006
Error	814.80	31	26.28		
Total	1315.33	33			

Test: Bonferroni Alfa=0.05 DMS=5.48291

Error: 26.2840 gl: 31

CONC	Medias	n	E.E.	
5	34.17	10	1.62	A
15	31.30	13	1.42	A
0	24.74	11	1.55	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

G3

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13998.27	2	6999.14	247.01	<0.0001
CONC	13998.27	2	6999.14	247.01	<0.0001
Error	878.42	31	28.34		
Total	14876.69	33			

Test: Bonferroni Alfa=0.05 DMS=5.69291

Error: 28.3360 gl: 31

CONC	Medias	n	E.E.	
15	60.76	13	1.48	A
5	58.45	10	1.68	A
0	16.43	11	1.60	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 10. Medidas estadísticas de resumen de la variable tamaño folicular

Tabla 18. Medidas estadísticas de resumen de la (Media ± Desviación estándar) de la variable tamaño folicular

FOL	Variable	n	Media	D.E.	E.E.
MAY	G1	17	24.61	24.79	6.01
MAY	G2	17	30.43	6.66	1.62
MAY	G3	17	44.96	21.62	5.24
MEN	G1	17	23.88	25.11	6.09
MEN	G2	17	29.61	6.12	1.48
MEN	G3	17	46.51	21.47	5.21

FOL: tamaño folicular

MAY: folículos mayores

MEN: folículos menores

G1: Grado 1: poco o nada de expansión de cúmulo

G2: Grado 2: expansión moderada de las capas del cúmulo

G3: Grado 3: expansión de todas las capas del cúmulo (ovocito madurado)



Anexo 11. Base de datos de valores angulares

Tablas 19. Datos de valores normales transformados a valores angulares para la prueba de homogeneidad

Datos originales					Datos transformados a valores angulares							
CONC	FOL	G1	G2	G3	G1	G2	G3	CONC	FOL	G1	G2	G3
0	MEN	66.67	20.83	12.50	0.82	0.46	0.35	0	MEN	0.96	0.47	0.36
0	MEN	63.33	20.00	16.67	0.80	0.45	0.41	0	MEN	0.92	0.46	0.42
0	MEN	55.00	30.00	15.00	0.74	0.55	0.39	0	MEN	0.84	0.58	0.40
0	MEN	54.55	27.27	18.18	0.74	0.52	0.43	0	MEN	0.83	0.55	0.44
0	MEN	66.67	20.00	13.33	0.82	0.45	0.37	0	MEN	0.96	0.46	0.37
0	MAY	50.00	32.14	17.86	0.71	0.57	0.42	0	MAY	0.79	0.60	0.44
0	MAY	59.26	24.07	16.67	0.77	0.49	0.41	0	MAY	0.88	0.51	0.42
0	MAY	65.22	17.39	17.39	0.81	0.42	0.42	0	MAY	0.94	0.43	0.43
0	MAY	52.63	26.32	21.05	0.73	0.51	0.46	0	MAY	0.81	0.54	0.48
0	MAY	60.00	23.33	16.67	0.77	0.48	0.41	0	MAY	0.89	0.50	0.42
0	MAY	53.85	30.77	15.38	0.73	0.55	0.39	0	MAY	0.82	0.59	0.40
5	MEN	10.87	34.78	54.35	0.33	0.59	0.74	5	MEN	0.34	0.63	0.83
5	MEN	8.70	34.78	56.52	0.29	0.59	0.75	5	MEN	0.30	0.63	0.85
5	MEN	6.25	40.63	53.13	0.25	0.64	0.73	5	MEN	0.25	0.69	0.82
5	MEN	6.67	26.67	66.67	0.26	0.52	0.82	5	MEN	0.26	0.54	0.96
5	MAY	8.11	29.73	62.16	0.28	0.55	0.79	5	MAY	0.29	0.58	0.91
5	MAY	3.13	34.38	62.50	0.18	0.59	0.79	5	MAY	0.18	0.63	0.91
5	MAY	7.69	46.15	46.15	0.28	0.68	0.68	5	MAY	0.28	0.75	0.75
5	MAY	6.67	30.00	63.33	0.26	0.55	0.80	5	MAY	0.26	0.58	0.92
5	MAY	6.25	31.25	62.50	0.25	0.56	0.79	5	MAY	0.25	0.59	0.91
5	MAY	9.52	33.33	57.14	0.31	0.58	0.76	5	MAY	0.31	0.62	0.86
15	MEN	5.00	30.00	65.00	0.22	0.55	0.81	15	MEN	0.23	0.58	0.94
15	MEN	7.69	30.77	61.54	0.28	0.55	0.78	15	MEN	0.28	0.59	0.90
15	MEN	6.67	24.44	68.89	0.26	0.49	0.83	15	MEN	0.26	0.52	0.98
15	MEN	7.14	32.14	60.71	0.27	0.57	0.78	15	MEN	0.27	0.60	0.89
15	MEN	10.00	30.00	60.00	0.32	0.55	0.77	15	MEN	0.32	0.58	0.89
15	MEN	9.09	27.27	63.64	0.30	0.52	0.80	15	MEN	0.31	0.55	0.92
15	MEN	9.09	36.36	54.55	0.30	0.60	0.74	15	MEN	0.31	0.65	0.83
15	MEN	12.50	37.50	50.00	0.35	0.61	0.71	15	MEN	0.36	0.66	0.79
15	MAY	7.14	38.10	54.76	0.27	0.62	0.74	15	MAY	0.27	0.67	0.83
15	MAY	3.57	25.00	71.43	0.19	0.50	0.85	15	MAY	0.19	0.52	1.01
15	MAY	9.52	38.10	52.38	0.31	0.62	0.72	15	MAY	0.31	0.67	0.81
15	MAY	6.67	30.00	63.33	0.26	0.55	0.80	15	MAY	0.26	0.58	0.92
15	MAY	9.09	27.27	63.64	0.30	0.52	0.80	15	MAY	0.31	0.55	0.92

FOL: tamaño folicular

MAY: folículos mayores

MEN: folículos menores

CONC: concentraciones de hCG (UI/mL)

G1: Grado 1: poco o nada de expansión de cúmulo

G2: Grado 2: expansión moderada de las capas del cúmulo

G3: Grado 3: expansión de todas las capas del cúmulo (ovocito madurado)





Figura 2. Esterilización de materiales de laboratorio



Figura 3. Preparación de medios solución madre para MIV



Figura 4. Preparación de medio de maduración y plaqueo



Figura 5. Obtención de ovarios en el centro de beneficio



Figura 6. Obtención de líquido folicular



Figura 7. Búsqueda de ovocitos

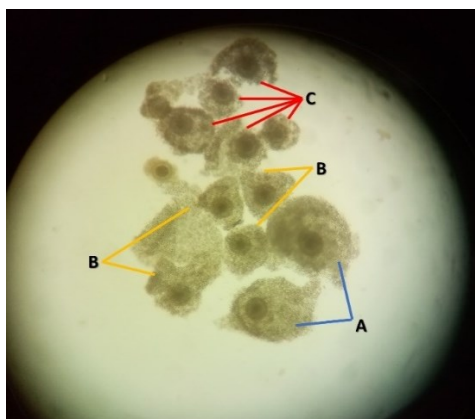


Figura 8. Categorización de ovocitos



Figura 9. Lavado y acostumbramiento al medio de maduración



Figura 10. Incubación en cámara de CO2



Figura 11. Evaluación post maduración

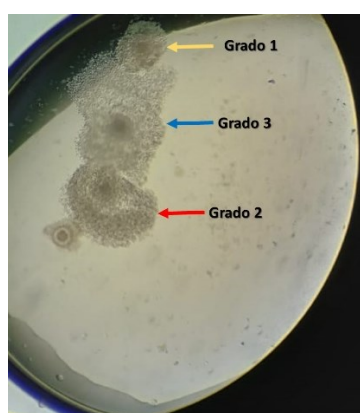


Figura 12. Clasificación de los ovocitos después de la maduración, según grado de maduración



Figura 13. Toma de los datos de maduración.



Figura 14. Toma de datos de vacas criollas