

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad y maduración de ovocitos
bovinos criollos. Ayacucho 2750 m.s.n.m. – 2018

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIA

PRESENTADO POR:

July Rocio Espinoza Sulca

Ayacucho- Perú

2019

A la adorada memoria de mi Madre Albina Sullca Quispe, por ser mí fuerza, la persona más importante en mi vida, por ser todo para mí y porque siempre en cada paso que doy hay una dedicatoria para ti.

A mi Padre Adrián Espinoza Campos, mi ejemplo de perseverancia, dedicación, entrega y trabajo. Por ser uno de mis motivos para seguir adelante y un sin fin de cosas que no podrían escribirse ni en todas las hojas de este trabajo.

A mis hermanos; Eden, Vladi, Lucia, Betzabe, Vilma, Ayde, Neri y Andy por ser mi ejemplo a seguir. A William y Deysi por ser parte de mi vida. A mis sobrinos por enseñarme en sus miradas y sonrisas que el amor es infinito. A toda mi familia, gracias.

A todos mis amigos y amigas por haber sido parte de mi formación universitaria, en especial a Alfredo Herrera Conde por aguantar mis cambios de humor cuando estaba agobiada, por el apoyo incondicional en todo momento y estar siempre alentándome a seguir, a ti mil gracias por todo.

JULY

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, la Facultad de Ciencias Agrarias, en especial a la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y a su plana de docente.

Al proyecto: Implementación de la Transferencia de Embriones en la Ganadería Alto andina Ayacucho financiado por el Vicerrectorado de Investigación de la UNSCH con fondos concursables del FOCAM/Resolución N° 391-2014-UNSCH-COG-R

Al M.V. Yisson Rojas Yupanqui, administrador del Matadero de la Comunidad Campesina de “Quicapata”- distrito de Carmen Alto.

Al Dr. Arturo Rodríguez Zamora, asesor, por ser parte de este camino de aprendizaje, por contagiarme de su entusiasmo en el trabajo de laboratorio, darme la iniciativa, el tiempo dedicado, por inspirarme a mejorar en el área de la investigación y por todo el apoyo incondicional durante el trabajo de investigación.

A mis coasesores M.V. Alfredo Pozo Curo y M.V. Lucy V. Sulca Ñaupas, por enseñarme que el conocimiento se adquiere con esfuerzo y dedicación.

A la Mg. Deysi J. Dipaz Berrocal, por enseñarme que de nada sirve saber si el conocimiento no se comparte.

Al M.V. Mijail Contreras Huamán, por todo el apoyo brindado durante el proceso de trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL	Pág.
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 Antecedentes.....	3
1.2. Bovino criollo en el Perú.....	4
1.3. Ovogénesis.....	5
1.4. Morfología del ovocito bovino.....	6
1.5. Maduración de ovocitos.....	7
1.6. Métodos empleados para la obtención de ovocitos.....	9
1.7. Crioconservación de ovocitos.....	11
1.8. Vitrificación.....	12
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	14
2.1. Ubicación.....	14
2.2. Materiales y equipos	14
2.3. Problemas específicos.....	16
2.4. Método procedimental:.....	16
2.5. Análisis estadístico	19
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	26
RECOMENDACIONES	27
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	28
ANEXOS.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Promedio de ovocitos de calidad A y B recuperados de 300 ovarios de bovinos criollos del Matadero de Quicapata. Ayacucho 2018.....	20
Tabla 3.2. Viabilidad según morfología de los ovocitos desvitrificados de bovinos criollos del Matadero de Quicapata. Ayacucho 2018.....	21
Tabla 3.3. Viabilidad mediante tinción vital de ovocitos desvitrificados de bovinos criollos del Matadero de Quicapata. Ayacucho 2018.....	22
Tabla 3.4. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos desvitrificados procedente de bovinos criollos del Matadero de Quicapata. Ayacucho 2018.....	23
Tabla 3.5. Niveles de expansión de las células del cúmulo de ovocitos desvitrificado post maduración <i>in vitro</i> de bovinos criollos del Matadero de Quicapata. Ayacucho 2018.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Expansión de cúmulo.....	9
Figura 1.2 Clasificación de ovocitos bovinos.....	11
Figura 2.3 Criterios de evaluación de la viabilidad de las células del cúmulo.....	18

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1. Diagrama de vitrificación y maduración de ovocitos bovinos criollos.....	35
Anexo N° 2. Preparación de los medios de manipulación, vitrificación y maduración <i>in vitro</i>	36
Anexo N° 3. Colecta de ovarios de bovinos criollos del Matadero de Quicapata.....	36
Anexo N° 4. Selección de los ovocitos bovinos criollos luego de la aspiración folicular y sedimentación del líquido folicular (ovocitos de tipo A y B).....	36
Anexo N° 5. Materiales para la vitrificación de ovocitos obtenidos a partir de ovarios de bovinos criollos.....	37
Anexo N° 6. Proceso de vitrificación de los ovocitos obtenidos a partir de ovarios de bovinos criollos (ovocitos tipo A y B).....	37
Anexo N° 7. Proceso de tinción por exclusión azul de tripán de ovocitos obtenidos a partir de ovarios de bovinos criollos.....	38
Anexo N° 8. Proceso de Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos obtenidos a partir de ovarios de bovinos criollos luego de la vitrificación.....	39
Anexo N° 9. Preparación de solución salina 0.9%.....	40
Anexo N° 10. Preparación de medio de manipulación.	40
Anexo N° 11. Preparación de medio de vitrificación y desvitrificación.....	40
Anexo N° 12. Preparación de medio maduración <i>in vitro</i>	40
Anexo N° 13. Procedimiento estadístico.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

(CPA)	Agente Crioprotector.
(AT)	Azul de Tripán.
(CGP)	Células Germinales Primordiales.
(CC)	Células del Cúmulo.
(CP)	Crioprotector.
(CCOs)	Complejo Ovocito Células del Cúmulus.
(DMSO)	Dimetilsulfóxido.
(GVBD)	Desglose de vesícula germinal
(EG)	Etilenglicol.
(EGF)	Factor de Crecimiento Epidermal.
(CD44)	Glicoproteína Implicada en la Adhesión entre Células.
(HDAC2)	Histona deacetilasa 2
(LH)	Hormona Luteinizante.
(FSH)	Hormona Folículo Estimulante.
(GH)	Hormona de Crecimiento.
(MII)	Metafase II.
(MI)	Metafase I.
(NL ₂)	Nitrógeno Líquido.
(ND)	No Diferenciado.
(OPU)	Ovum Pick Up.
(PR)	Profase.
(PI)	Profase I
(CASP3)	Proteína codificada por el gen
(VG)	Vesícula Germinal.
(ZP)	Zona Pelúcida.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo observar el efecto de la vitrificación sobre la viabilidad y maduración de ovocitos bovinos criollos procedentes del matadero. Los vacunos criollos fueron seleccionados por fenotipo antes del faenado. Los ovarios fueron transportados en solución salina fisiológica (0.9%) a temperatura de 25-35°C, el diámetro folicular considerado fue de 2-7 mm, y la aspiración se hizo con una jeringa de 10 ml, aguja N° 18 G los ovocitos se recibieron en solución de manipulación suplementada con 3% de suero fetal bovino. Los ovocitos recuperados fueron seleccionados por el número de capas de los cúmulos y la homogeneidad del citoplasma. Sólo los ovocitos de calidad excelente y buena fueron criopreservados con la técnica de vitrificación. Esta técnica consistió en someter los ovocitos a dos soluciones: 1) Solución de equilibrio (TCM-199+HEPES; 7.5% etilenglicol, 7.5% dimetilsulfoxido (DMSO), 20% suero fetal bovino (SFB), 50 µg/ml gentamicina); y 2) Solución vitrificante (TCM-199 + hepes; 15% de etilenglicol, 15% DMSO, 0.5M sucrosa, 20% SFB, 50 µg/ml gentamicina), luego los ovocitos fueron puestos en dispositivos criotops (3 a 5 ovocitos/dispositivo) y sumergidos inmediatamente en nitrógeno líquido. Después de 24 hr los ovocitos fueron sometidos a dos soluciones desvitrificantes: 1) TCM-199+HEPES+1M de sucrosa (1min, 37°C), y 2) TCM-199+hepes+0.5M de sucrosa (3min a 37°C). Inmediatamente fueron evaluados según dos criterios: el primero con tinción azul de tripán (0.05%) y el segundo mediante la maduración *in vitro* (MIV). Los resultados de vitalidad según la tinción muestran diferencias ($p < 0.05$) entre grupo control (86.8%) y el vitrificado (60.9%). En cuanto a la viabilidad por MIV (maduración *in vitro*) el medio utilizado fue TCM-199 (9ml) + SFB (1ml) + piruvato (20µl) + FSH-LH (50µl) + glutamina (60µl) + EGF (10µl) + estradiol (10µl) + gentamicina (10µl), y se observó un 89.0% para el grupo control y un 58.8% para el grupo de vitrificados ($p < 0.05$). En base a los datos obtenidos se concluye que las vitrificaciones de ovocitos bovinos pueden ser sometidos a criopreservación por la técnica de vitrificación y posterior a esta técnica llegar a la maduración, siendo una alternativa a considerar para futuras investigaciones de criopreservación de ovocitos.

Palabras clave: ovocitos, bovinos criollos, vitrificación, tinción vital, maduración *in vitro*

INTRODUCCIÓN

El bovino criollo está siendo sustituido por razas mejoradas las cuales estarían provocando procesos de erosión genética desaprovechando su condición de raza primaria adquirida a través del tiempo. Por otra parte, la crioconservación de células vivas es una herramienta que permite el almacenamiento indefinido del material biológico proveniente de diversas especies animales vulnerables o en peligro de extinción sin pérdida funcional de su actividad y sin alteraciones genéticas, esto posibilitaría el aprovechamiento del gran potencial de genes útiles del bovino criollo.

En las últimas dos décadas se han realizado considerables esfuerzos en poner a punto los procedimientos de crioconservación (congelación lenta y vitrificación) de ovocitos de animales domésticos, siendo la vitrificación el método de crioconservación más utilizado en los últimos años. La vitrificación proporciona una alternativa rápida y sencilla sobre los métodos de crioconservación convencionales. Dicho proceso evita el riesgo potencial de daño celular causado por la formación de hielo intracelular, pero la exposición a altas concentraciones de los agentes crioprotectores requeridos para el proceso puede originar citotoxicidad y alteraciones osmóticas, afectando adversamente el desarrollo del ovocito después de la criopreservación (Cha et al., 2000). La vitrificación ha sido intentada en ovocitos bovinos (Fuku et al., 2002) y se ha comprobado que la sobrevivencia del ovocito después del proceso de criopreservación es dependiente de una combinación de factores biofísicos (Fabbri et al., 2001).

Por esta razón se quiere ahondar en el estudio de protocolos estandarizados de obtención y crioconservación de ovocitos, mediante el estudio de la viabilidad post vitrificación ya que de este modo se podrá obtener un protocolo ideal de crioconservación del gameto femenino del bovino criollo ayacuchano para contribuir en futuras investigaciones en el campo de la biotecnología. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron:

- Determinar el efecto de la vitrificación sobre la tasa de viabilidad y el grado de calidad de ovocitos bovinos recuperados a partir de ovarios de matadero.

- Evaluar la maduración *in vitro* pos vitrificación de ovocitos bovinos criollos a partir de ovarios de matadero según la valoración de la expansión de los cúmulos.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

Sprícigo et al., (2014) tuvieron como objetivo investigar los patrones funcionales, morfológicos y moleculares de los ovocitos bovinos vitrificados en diferentes momentos durante la maduración *in vitro* (IVM). Se utilizaron cuatro grupos: ovocitos de control no vitrificados (CG), ovocitos vitrificados a las 0 h (V0), ovocitos vitrificados después de 8 h de IVM (V8) y ovocitos vitrificados después de 22 h de IVM (V22). Después de la vitrificación, los ovocitos se atemperaron y luego se devolvieron a la incubadora para completar un total de 24 h de IVM. Para evaluar el efecto de la vitrificación, se evaluaron las tasas de maduración nuclear y fertilización mediante tinción lacmoidea y microscopía electrónica ultra estructural. Las tasas de división y de blastocitos se evaluaron en D2, D7 y D8. Los niveles de expresión de CASP3, TP53, HDAC2, SUV39H1 y DNMT1 fueron investigados por RT-qPCR. Las tasas de maduración nuclear, fertilización de ovocitos, división y blastocitos fueron mayores ($P < 0.05$) en el grupo CG (80%; 81.3%; 88.5%; y 35.8%) que en el V0 (44%; 44.6%; 22.7%; y 2.6%), V8 (50%; 63%; 21.5%; y 2.2%) y V22 (55.5%; 66.9%; 24.1%; y 4.6%). El análisis ultra estructural reveló daños significativos dentro del citoplasma de todos los grupos vitrificados, pero se observó una degeneración más severa en el grupo V22. Los perfiles de expresión génica no se vieron afectados por la vitrificación ($P > 0.05$). En conclusión, la degeneración del citoplasma parece ser la forma más grave de daño causado por la vitrificación.

Ruiz et al., (2010) en el siguiente estudio tuvieron como objetivo evaluar el efecto de la vitrificación en la viabilidad de ovocitos activados químicamente para la producción de embriones partenogénicos bovinos. Ovocitos bovinos aspirados de ovarios obtenidos en matadero fueron madurados *in vitro* por 20-22 horas y se distribuyeron en los siguientes grupos. I (n=76): ovocitos

vitrificados/descongelados, II (n=119): ovocitos expuestos a crioprotectores sin vitrificación y III (n=142): ovocitos control. Los ovocitos fueron vitrificados en microgotas sobre un papel de aluminio pre enfriado flotando en nitrógeno líquido, utilizando una solución de equilibrio con 4% de etilenglicol y una solución de vitrificación con 35% de etilenglicol 5% de polivinilpirrolidona y 0,4 M de trehalosa. Las microgotas vitrificadas fueron almacenadas en nitrógeno líquido y fueron descongeladas 1-3 días después del almacenamiento. Los tres grupos de ovocitos se activaron partenogenéticamente por exposición de 4 minutos a 5 μ M de ionomicina de Ca a temperatura ambiente seguido de una incubación por 5 horas en 6-dimetilaminopurina a 38,5 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂. Los embriones se cultivaron en medio mSOF durante 8-9 días. Las tasas de ovocitos sobrevivientes fueron 55,1% y 93,7% para ovocitos vitrificados/descongelados (I) y expuestos (II), respectivamente. Las tasas de segmentación de 55,3%, 72,3% y 74,6%, y de desarrollo hasta blastocistos fueron 7,1%, 17,4% y 21,7% en los grupos I, II y III respectivamente. Estos resultados demuestran que la técnica de vitrificación ha quedado establecida y permite la producción de embriones partenogenéticos bovinos.

1.2. Bovino criollo en el Perú

El bovino Criollo en el Perú actual es la descendencia del ganado introducido por los españoles a mitad del siglo XVI, claro que en diferente grado de pureza, habiéndose mantenido en la mayoría de los casos puro y con ciertas características según los ecosistemas donde se ha adaptado.

El ganado Criollo es un biotipo proveniente del ganado vacuno que trajeron los españoles hace más de 400 años (regiones de Extremadura, Andalucía, Murcia y Cataluña). En el Perú, podemos considerar un tipo de ganado Criollo típico, no mejorado, que se conoce como chusco; es valioso por su rusticidad, gran adaptación al medio y por ser usado para triple propósito: carne, leche y trabajo. El ganado Criollo conforma la población base de la actual ganadería alto andina de subsistencia. Juegan un rol importante en el ingreso familiar y la seguridad alimentaria de los campesinos de la sierra peruana y constituye uno de los medios de mitigación de la migración del campo a la ciudad. Por ello, es de interés conocer la variabilidad genética de estas poblaciones para el desarrollo de planes de conservación y uso sostenible, y contribuir a una mejor calidad de vida de las comunidades campesinas. Del total de ganado vacuno existente en el Perú, el 63% representa ganado Criollo. En realidad, ese porcentaje engloba al ganado Criollo con diferentes grados de

cruzamiento con otras razas introducidas al país. Se estima que el ganado bovino Criollo mantenido como puro representaría una cifra mucho menor, que oscilaría alrededor del 20%, situación muy preocupante, toda vez que se trata de un recurso que se encuentra amenazado por ausencia de planes de conservación y que, al someterse a cruzamientos indiscriminados con otras razas, se pierde para siempre como material genético puro (INEI-2012).

Esto constituye una paradoja a nivel mundial, ya que muchos países como España se ha lanzado a programas de recuperación de sus razas autóctonas, habiéndose logrado en la mayoría de sus razas bovinas y ovinas; otras se encuentran en proceso de recuperación y las hay también aquellas declaradas como extintas. En nuestro país, poco o nada se está haciendo en términos de conservación de este importante recurso zootécnico, a pesar que desde inicios del presente Siglo la FAO ha categorizado al Bovino Criollo, junto con otras especies como la Alpaca Suri, Vicuña, Guanaco y Morochuco Chumbivilcano, en estado vulnerable (INEI-2012).

1.3. Ovogénesis

Desde la etapa embrionaria se forman los gametos femeninos. De células indiferenciadas se generan las células germinales primordiales (Byskov, 1982). Las células germinales primordiales migran a la cresta genital, para así formar el futuro ovario (Gondos, 1978). Estas células se multiplican por mitosis y una parte de estas se diferenciarán y formarán las ovogonias, a partir de las que se formará el ovocito. La gametogénesis comienza en la vida intrauterina (Baker, 1982), en la cual es necesario una reducción cromosómica (la ovogonia tiene una dotación cromosómica $2n$ y el ovocito tiene n) y un proceso de crecimiento del ovocito, como también sustancias nutritivas necesarias para mantener los estadios iniciales del desarrollo embrionario. El proceso de reducción cromosómica se denomina meiosis la cual inicia en etapa embrionaria y culmina al momento de la fecundación. Las ovogonias se multiplican por meiosis, convirtiéndose en ovocitos primarios, inducida por una sustancia proveniente de las células embrionarias (Baker y Franchi, 1967). Este tipo de multiplicación celular se detendrá en dos momentos específicos: alrededor del nacimiento y en la ovulación y solo se completará totalmente al producirse la fecundación del ovocito. El proceso meiótico consta de dos divisiones llamadas meiosis I y II, divididas cada una a su vez en cuatro fases: Profase, Metafase, Anafase y Telofase, indicado con los términos I y II a su correspondencia a una u otra división. La meiosis I se completa con la profase I y comienza antes

del nacimiento (Zuckermann, 1962). La ovogonia entra en esta fase que a su vez se subdivide en otras, caracterizada por amplios cambios de material cromosómico. El hecho más importante de la profase I, es que al llegar al estadio de dictioteno, el ovocito detiene tanto la meiosis como su crecimiento, hecho que coincide con el momento del nacimiento (Baker y Franchi, 1967). El estadio de dictioteno se caracteriza por la presencia de un núcleo prominente que recibe el nombre de vesícula germinal (Franchi et al., 1962). El ovario de la hembra recién nacida, contiene muchos ovocitos, detenidos nuclearmente en la primera división de la meiosis (ovocitos primarios) y rodeado por el estroma epitelial ovárico formando folículos primordiales. El número de gametos que poseen las hembras domésticas está fijado desde el mismo momento de su nacimiento, y durante toda la vida del animal se irán liberando.

1.4. Morfología del ovocito bovino

En el bovino, el ovocito es una célula grande y esférica. Un ovocito maduro es aquel que se libera en la ovulación; se caracteriza porque muestra el primer cuerpo polar en el espacio perivitelino y es una célula que se encuentra detenida en la metafase de su segunda división meiótica, es decir en metafase II (MII). Es la célula aislada más grande del organismo.

Otra característica del ovocito en MII es que los componentes subcelulares son extremadamente sensibles a los cambios de temperatura, osmolaridad e iones (Mc Williams et al., 1995).

Los ovocitos maduros presentan una gran heterogeneidad en la distribución y organización de los organelos citoplasmáticos y en la permeabilidad de la membrana al agua (Fabbri et al., 2000). Están rodeados por las células de la corona y más externamente por las células granulosas del cúmulo (Hafez et al., 1996).

El ovocito inmaduro, con vesícula germinal visible, es decir, en profase I (PI), tiene los cromosomas condensados y localizados dentro del núcleo o vesícula germinal. Están protegidos por la membrana nuclear a diferencia de los cromosomas del ovocito en MII. En el ovocito inmaduro no se ha formado el huso meiótico. La congelación de ovocitos en PI previene la alteración del huso y la aneuploidía (Eroglu et al., 1988).

1.4.1. Estructura y composición de la célula del cúmulo

El cúmulo está formado por varios miles de células de la granulosa formando una compleja matriz extracelular. El mayor componente de esta matriz es el ácido hialurónico, un polímero ramificado (1,4 ácido glucurónico: 1,3 acetilglucosamida). Los componentes proteicos, incluyen elementos comunes en muchas matrices extracelulares como colágeno, laminina, fibronectina, tenacina-C. El ácido hialurónico está fusionado a las proteínas de unión al CD44 y posiblemente a la fibronectina asociada a las integrinas de superficie en las CC. La CD44 y las integrinas pueden iniciar el proceso de traducción de señales por unión y activación de una amplia gama de regulaciones intracelulares o proteínas de andamio. Alguna alteración de la matriz puede regular la fisiología de las CC (Floman y Ducibella, 2006).

La comunicación entre las CC y el ovocito es fundamental durante la maduración, por la generación de una señal positiva de las CC en respuesta a los factores producidos por el ovocito para estimular la ruptura de la VG y completar la maduración nuclear del ovocito. Además, la presencia de las CC durante la maduración ayuda al ovocito para que tenga la habilidad de formar el pronúcleo masculino después de la fertilización (Shirazi et al., 2007).

1.5. Maduración de ovocitos

El proceso de maduración de ovocitos bovinos comprende procesos altamente especializados, mediante los cuales el ovocito evoluciona de profase a metafase promoviendo la maduración nuclear, donde en el ovocito se produce el proceso de división celular (meiosis) dado un aumento de la hormona luteinizante (LH), o también cuando es sometido al proceso de maduración *in vitro* (Block, 2011). Éste proceso se cumple en un periodo de 24 horas, donde el ovocito alcanza la maduración nuclear (metafase) y queda latente hasta el momento de ser fertilizado. En éste momento se da la formación pro nuclear; así mismo, es necesaria la maduración del citoplasma del ovocito, pues mediante ésta, el ovocito queda listo para ser fertilizado y logra aportar los elementos requeridos para el desarrollo embrionario (Ferreira, 2010).

El proceso de meiosis se inicia en el ovario de los fetos hembras y se detiene previo al nacimiento en la etapa de profase, donde detienen su desarrollo y se estancan en una fase llamada reticulada, que consiste en un estado de reposo del núcleo y queda así hasta la pubertad (Ferreira, 2010). Dichos ovocitos inmaduros, y que entraron en reposo poseen un núcleo de gran tamaño que se

llama vesícula germinal desde donde parte la meiosis desde profase hasta la metafase donde el primer cuerpo polar es expulsado al espacio perivitelino (Zarate, 2006).

1.5.1. Maduración *in vitro* de ovocitos

El objetivo de la maduración *in vitro* es lograr en el laboratorio que los ovocitos sigan las mismas transformaciones durante el periodo de maduración folicular previo a la ovulación, y así, obtener ovocitos viables para la fecundación y desarrollo embrionario (Gordon, 2004).

Bajo el microscopio, el primer signo evidente que la meiosis se reanuda es la disolución de la membrana nuclear (GVBD), la expulsión del primer corpúsculo polar, y la expansión de las células de los cúmulos que rodean al ovocito (Gordon, 2003).

1.5.2. Morfología del ovocito maduro

Se caracteriza por la expansión total del cúmulo celular y por la presencia del primer corpúsculo polar (Leibfried y First, 1979). A nivel nuclear, los cromosomas presentan la configuración de metafase II. Los cambios citoplasmáticos no se completan hasta las 30 horas de haber comenzado la maduración, aunque nuclearmente la maduración finaliza a las 24 horas (Hyttel, 1988). Estos cambios citoplasmáticos incluyen, sobre todo, dos procesos: la colocación de los gránulos corticales a la periferia, situándose bajo la membrana plasmática (Ducibella et al., 1988). En esta fase final de la maduración, sigue existiendo una alta actividad de síntesis proteica con el fin de preparar al ovocito, nuclear y citoplasmáticamente, para la fecundación (Loos et al., 1992).

Estos fenómenos cronológicos, descritos en la maduración se corresponden tanto en los ovocitos madurados *in vivo* como *in vitro* (Hyttel, 1988). Las diferencias más notables entre ambos tipos de maduración, consisten fundamentalmente en que los ovocitos madurados *in vitro* sufren, por un lado, un retraso en la migración de los gránulos corticales a la periferia del ovocito (Cran, 1989; Hyttel et al., 1986) y por otro, presentan un mayor número de prolongaciones celulares, provenientes de las células de la corona radiada, en el espacio peri vitelino (Loos et al., 1992). Por lo tanto, los criterios que aseguran que ha ocurrido la maduración *in vitro* pueden resumirse en: 1) Extrusión del primer corpúsculo polar y llegada al estadio de metafase II. 2) Expansión y mucificación del cúmulo celular. 3) Traslado de los gránulos corticales a la periferia del ovocito 4) Desaparición de las uniones intercelulares. Aunque estos criterios de maduración son aceptados

por la mayoría de los autores, todos ellos están de acuerdo en que el mejor criterio de una correcta maduración es comprobar la capacidad del ovocito para ser fecundado y seguir su desarrollo embrionario de una manera completamente normal.

1.5.3. Criterios de Maduración *in vitro*

El criterio de expansión del cúmulo (Lorenzo, 1992) fue el siguiente:

- 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.

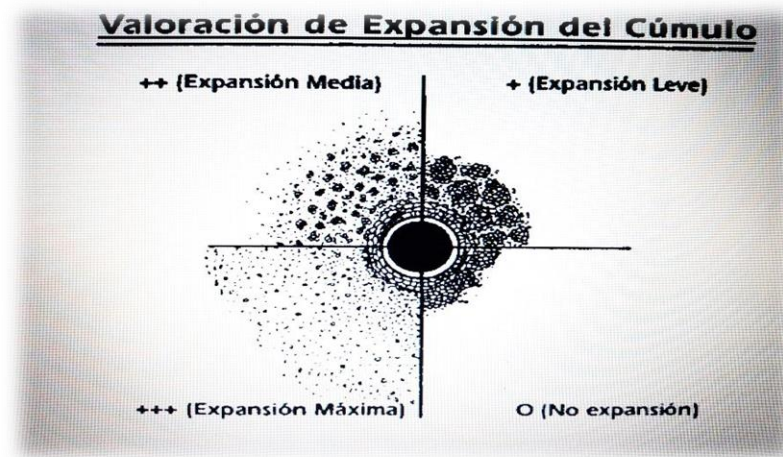


Figura 1.1. Expansión de cúmulo

Fuente: Lorenzo, (1992)

1.6. Métodos empleados para la obtención de ovocitos

Los ovarios contienen un elevado número de folículos que se encuentran en diferentes estados de desarrollo (primordiales, en crecimiento, atrésicos), de los cuales, solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se volverían atrésicos, con el fin de aprovechar al máximo el potencial genético de una donadora, usando procedimientos *in vitro* (Gordon y Lu, 1990). Dentro de las técnicas existentes para la

recolección de ovocitos de hembras vivas, se encuentran la laparotomía-laparoscópica y la aspiración para animales muertos; la obtención de ovocitos de animales muertos se hace mediante la recolección de ovarios de vacas sacrificadas en el matadero. Esta técnica suministra una fuente abundante de ovocitos obtenidos a bajo costo, provenientes de animales en diferentes estados del ciclo estral, que pueden ser madurados, criopreservados, fertilizados y cultivados *in vitro* hasta alcanzar estados avanzados de desarrollo embrionario (Gordon y Lu, 1990).

La recolección de ovocitos provenientes de ovarios obtenidos en matadero se puede hacer por medio de dos métodos: el corte de ovarios y la aspiración con jeringa de folículos superficiales mayores de 2 mm de diámetro (Seneda et al., 2001).

En el caso de la aspiración de ovocitos con jeringa, los folículos ováricos superficiales visibles de 2 a 7 mm de diámetro son aspirados con jeringa de 5 o 10 ml y aguja hipodérmica estéril calibre 18, posteriormente el líquido folicular es depositado en cajas de Petri para realizar la búsqueda de los ovocitos aspirados (Lonergan et al., 1991).

1.6.1. Clasificación de ovocitos

El primer criterio para discriminar entre ovocitos competentes e incompetentes para el desarrollo embrionario es la morfología del citoplasma y de las células del cúmulo. La calidad de las envolturas celulares que rodean el ovocito y la apariencia del citoplasma son los mejores indicadores del potencial que éste posee para la maduración y fertilización *in vitro* (Leibfried et al., 1989).

Las células del cúmulo son subpoblaciones de células de la granulosa que proveen de nutrientes al ovocito durante su crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida, y sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización (Arlotto et al., 1996).

Los ovocitos pueden ser clasificados de acuerdo al número de capas de células del cúmulo y la apariencia del citoplasma. El tipo A corresponde a un ovocito con células del cúmulo con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente; el tipo B tiene capas múltiples del cúmulo (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras; el tipo C se caracteriza por poseer un cúmulo desnudo y un citoplasma irregular con

zonas oscuras; el tipo D tiene un cúmulo con células expandidas y un citoplasma irregular con zonas oscuras (Lonergan et al., 1991).

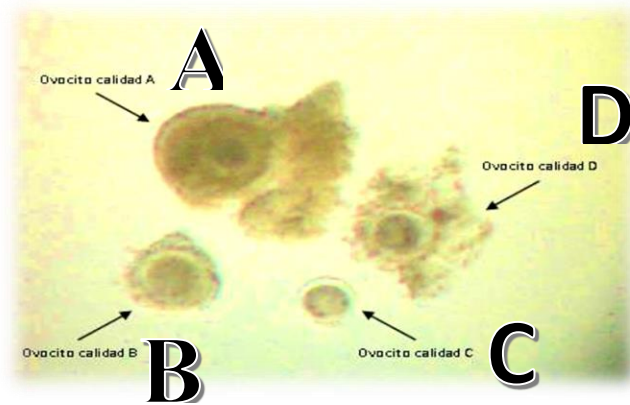


Figura 1.2. Clasificación de ovocitos bovinos

Fuente: Zarate (2006)

1.7. Crioconservación de ovocitos

El ovocito es un tipo celular único que posee un gran tamaño y una baja relación superficie-volumen. Además, está rodeado por la zona pelúcida (ZP) y por varias capas de células del cúmulo. La presencia de estas capas celulares que rodean al ovocito y que juegan un papel importante durante la etapa de crecimiento del ovocito mediante una cooperación metabólica, hacen de este tipo celular una estructura muy difícil de crioconservar (Massip, 2003). Hasta la actualidad, se ha podido crioconservar ovocitos de varias especies animales utilizando diferentes técnicas y crioprotectores. Desafortunadamente los protocolos desarrollados para una especie en concreto son usualmente muy difíciles de adaptar a otra especie debido a diferencias en el tamaño del ovocito y a su sensibilidad al enfriamiento y a los crioprotectores (Shaw et al., 2000). El factor más crítico para la crioconservación de ovocitos es su compleja organización sub celular, los efectos del enfriamiento afectan a los elementos del citoesqueleto como son la placa metafásica o la integridad de los micro túbulos (Shaw et al., 2000) y también puede afectar a los gránulos corticales produciendo el endurecimiento de la zona pelúcida (Parks y Ruffing, 1992).

1.7.1. Crioprotectores

Los embriones, al ser congelados, necesitan ser deshidratados parcialmente a fin de evitar la formación de cristales que lesionan las estructuras citoplasmáticas (Mazur, 1984). Esta

deshidratación se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación. En la congelación de embriones se utilizan dos tipos de crioprotectores:

- Permeables o intracelulares: De bajo peso molecular, Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma (Miyake et al., 1993).
- Impermeables o extracelulares: De alto peso molecular, polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano sorbitol, sucrosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azúcares (Kuleshova et al., 1999), estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua; deshidratan junto con el crioprotector las células de los embriones durante el equilibrio (Sommerfeld y Nieman, 1999).

1.8. Vitrificación

La vitrificación se define como la transición de las soluciones acuosas de un estado líquido a un estado vítreo sólido sin la formación de cristales, es decir, que, debido al rápido descenso de temperatura, la viscosidad de la muestra aumenta hasta un punto en que las moléculas se inmovilizan. De esta forma, se encuentran en un estado sólido, aunque su estructura molecular sea la de un líquido extremadamente viscoso o estado vítreo (Critser et al., 1997). Este aumento extremo de la viscosidad requiere velocidades de enfriamiento muy rápidas (superiores a 2500 °C/min) o elevadas concentraciones de crioprotectores (de 5 a 7 M) (Shaw et al., 2000; Vajta, 2000). La vitrificación presenta numerosas ventajas como la total eliminación de hielo o la disminución del daño causado por el enfriamiento, puesto que atraviesa el rango de temperatura de +15 a -5 a velocidades de enfriamiento muy rápidas (Isachenko et al., 1998). Otra gran ventaja de esta técnica es que no requiere de equipos de congelación caros o sofisticados y puede ser realizada de manera muy sencilla.

La consecuencia negativa de esta estrategia radica en el incremento de las probabilidades de lesionar las células debido al choque osmótico y a la toxicidad de los crioprotectores. Sin embargo, se han aplicado diferentes protocolos para intentar disminuir estos efectos negativos, como el uso

de crioprotectores menos tóxicos a la combinación de crioprotectores (disminuyendo la toxicidad individual de cada uno, pero manteniendo las propiedades osmóticas y crioprotectoras), la utilización de crioprotectores por etapas y/o la utilización de soluciones concentradas pre enfriadas (Vajta, 2000).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación

El estudio de investigación se realizó en la Región Ayacucho, Provincia Huamanga, Distrito Ayacucho a 2750 m.s.n.m.

2.1.1 Trabajo de campo

Para el trabajo de investigación se realizó la toma de muestras del Matadero de la Comunidad Campesina de “Quicapata” del distrito de Carmen Alto, Provincia Huamanga, Región Ayacucho a 2750 m.s.n.m.

2.1.2 Trabajo de laboratorio

El trabajo de investigación se realizó en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Laboratorio de Reproducción y Biotecnología Animal de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria.

2.2. Materiales y equipos

2.2.1 Material de laboratorio

- 01 Termo con termómetro
- 01 Micropipeta de 10 µl, 20 µl y 1000 µl
- Puntas para micropipeta (blancas, amarillas y azules)
- Cryotop
- 01 Bolsa de placa Petri de 100 ml (cuadrículadas)
- 01 Bolsa de placas Petri de 35 ml
- Vasos precipitados de 100 y 250 ml

2.2.2 Reactivos y Medios

- Solución salina 0.9%
- Gentamicina
- Alcohol al 70%
- Medio de maduración
 - ✓ TCM-199
 - ✓ Suero fetal bovino
 - ✓ Piruvato
 - ✓ FSH, LH
 - ✓ Glutamina
 - ✓ EGF
 - ✓ Estradiol
- Medio de vitrificación
 - ✓ Etilen Glycol
 - ✓ Dimetilsulfoxido (DMSO)
 - ✓ Sucrosa
- Medio de desvitrificación
 - ✓ Sucrosa
- Azul de tripán
- Medio de manipulación
- Nitrógeno líquido

2.2.3 Equipos y aparatos

- Cámara de flujo laminar
- 01 Tanque de nitrógeno
- 01 Estereoscopio Nikon®
- 01 Microscopio Accu-Scope®
- 01 Platina térmica Minitube®
- 01 Regla milimétrica
- 01 Baño María Kendal Gemmyco

- Incubadora

2.2.4 Otros

- 01 Caja guantes de látex talla XS
- 01 Caja de jeringas de 10 ml
- 01 Bolsa de tubos falcón de 15 ml
- Agujas N° 18
- 01 Bolsa de pipetas Pasteur desechable
- 01 Guardapolvo blanco

2.3. Problemas específicos

- ¿De qué manera el protocolo de vitrificación influye sobre la tasa de viabilidad de los ovocitos bovinos?
- ¿De qué manera el protocolo de vitrificación influye sobre la tasa de maduración de los ovocitos bovinos?

2.4. Método procedimental

a. Material biológico

Los ovocitos fueron recuperados del Matadero de Quicapata en los meses de julio a diciembre del 2018, a partir de 150 vacas criollas previamente identificadas por sus propias características de color de manto y estructura corporal. Así mismo, los ovarios fueron seleccionados según criterio de selección siguiente: ovarios sin presencia de quistes foliculares, ovarios con presencia de folículos, cuerpos lúteos, hemorrágicos y albicans. Los cuales fueron transportados al laboratorio en solución salina (NaCl al 0.9%), conteniendo antibiótico (gentamicina 50µg/ml) a una temperatura de 37°C.

b. Recuperación de ovocitos por aspiración folicular

- Los ovocitos se aspiraron de los folículos ováricos de 2-7 mm de diámetro.
- La aspiración se realizó con jeringa de 10 ml con una aguja hipodérmica calibre 18 y el líquido folicular se depositó en tubos Falcón en baño María a 37°C.

- Se dejó sedimentar por 15 min y se depositó el sedimento en una placa de Petri con medio de manipulación para la búsqueda de los ovocitos en estereoscopio.

c. Selección y clasificación de ovocitos

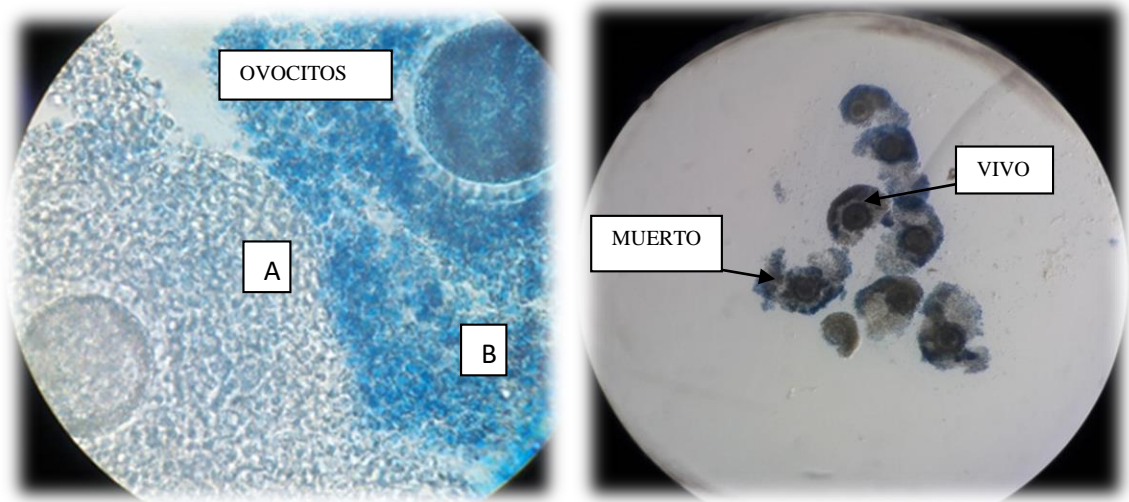
Los ovocitos fueron clasificados de acuerdo al número de capas de células del cúmulo y la apariencia del citoplasma. El tipo A corresponde a ovocitos con células del cúmulo con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente; el tipo B tiene capas múltiples de cúmulos (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras.

d. Vitrificación de ovocitos

- Se utilizaron dos soluciones; una solución de equilibrio (7.5% ethylene glycol + 7.5% dimethylsulfoxide (DMSO) + 20% suero fetal bovino + 50µg/ml gentamicina por 9 minutos.
- Una solución de vitrificación (15% ethylene glycol + 15% DMSO + 0.5 M sucrosa + 20% suero fetal bovino + 50µg/ml gentamicina) donde se mantuvo al ovocito por 1 minuto.
- Los ovocitos se colocaron en criotop y se sumergieron de inmediato en el nitrógeno líquido (Spricigo et al., 2014).

e. Desvitrificación de ovocitos

- Los criotop fueron extraídos del tanque de nitrógeno líquido, para luego ser colocados al medio de desvitrificación que consta de dos soluciones, la primera (1M sucrosa+ 20% suero fetal bovino + 50µg/ml gentamicina) a 37° C por un minuto, la segunda (0.5 M sucrosa+ 20% suero fetal bovino + 50µg/ml gentamicina) a 37°C por 3 minutos (Spricigo et al., 2014).
- Luego se colocaron en una placa Petri que contenía gotas de medio de manipulación y fueron lavados dos veces.
- Se colocaron en placas para su tinción con azul de tripán al 0.05% por dos minutos (Gupta et al., 2002).
- Finalmente se realizó un lavado en gotas de medio de manipulación y evaluó la viabilidad y morfología al microscopio 40 X.



Fuente: Sulca (2016)

Figura 2.3: Criterios de evaluación de la viabilidad de la célula del cúmulo. En A las células incoloras se consideraron como vivas A y en B las teñidas se consideraron como muertas.

- Se evaluó la viabilidad ovocitaria según morfología; los ovocitos fueron examinados en el estereoscopio considerándose que habían sobrevivido al proceso de vitrificación, aquellos que no presentaban lisis celular, con membrana celular intacta y citoplasma homogéneo. Los ovocitos que presentaban algún signo de degeneración, como ruptura de la membrana o citoplasma contraído u oscuro fueron considerados como no viables.

f. Maduración *in vitro* de ovocitos

- Se colocaron en la incubadora de CO₂ el medio de manipulación y las placas con medio de maduración 2 a 3 horas antes de realizar el proceso.
- Se depositó en cada gota de medio entre 25 a 30 ovocitos, estos se colocaron lo más juntos posibles, ya que las células del cúmulo segregan los factores de maduración lo cual tiene un mayor efecto si estas están más junta.
- Se llevó la placa con los ovocitos a la incubadora de CO₂ por un periodo de 24 horas a 38.5°C; 5% de Oxígeno; 5% de CO₂.

2.5. Análisis estadístico

Para determinar viabilidad, vitalidad y maduración se usó la prueba de proporciones del Programa R® versión 3.4.3. (30-11-2017).

$$Z_{\text{prueba}} = \frac{\frac{X_1}{n_1} - \frac{X_2}{n_2}}{\sqrt{p(1-p)\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

Dónde:

p: proporción muestral

X1: número de aciertos en la muestra 1

X2: número de aciertos en la muestra 2

n1: número de observaciones en la muestra 1

n2: número de observaciones en la muestra 2

Para niveles de expansión de las células del cúmulo se utilizó la prueba de Fischer Diferencia de Proporciones Minitab® 17.1.0

$$p = \frac{\binom{a+b}{a} \binom{c+d}{c}}{\binom{n}{a+c}} = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{a! b! c! d! n!}$$

Muestras: (a+b), (c+d), (a+c) y (b+d)

Probabilidades: a! b! c! d! n!

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. DE LOS OVOCITOS RECUPERADOS

El rendimiento promedio de recuperación de ovocitos viables (A y B) fue de 3.8 ovocitos por ovario. (Tabla 3.1) Según la calidad fue 1.8 ovocito/ovario para el tipo A y 2.0 para el tipo B, lo cual fue mayor a lo reportado por Lonergan *et al.* (1991) quien obtuvo 1.55 tipo A; Zárate, (2006) quien obtuvo un 1.59 de calidad A y 1.32 de calidad B. En contraste, nuestros resultados son inferiores a lo reportado por Carolan *et al.* (1994) quien obtuvo 4.3 de calidad A y 2.5 de calidad B, esta superioridad podría deberse a diversos criterios como: la edad, estado fisiológico, al método de recuperación de los ovocitos que mediante el método de disección se obtienen mayor cantidad de ovocitos de mejor calidad. Por lo tanto la correcta selección y clasificación antes de la maduración de los ovocitos es un proceso que reduce las opciones de elegir un ovocito no viable.

Tabla 3.1 Promedio de ovocitos de calidad A y B recuperados de 300 ovarios en bovinos criollos del Matadero de Quicapata. Ayacucho 2018.

	Calidad	N°	%	Promedio por ovario
Ovocitos recuperados	A	546	47.6	1.8
	B	601	52.4	2.0
	Total	1147	100	3.8

3.2. VITRIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE OVOCITOS POST DESVITRIFICADOS.

Tabla 3.2. Viabilidad según morfología de los ovocitos desvitrificados de bovinos criollos del Matadero de Quicapata. Ayacucho 2018.

Ovocitos vitrificados		Ovocitos desvitrificados			
		Viables		No Viables	
N°	%	N°	%	N°	%
344	100.0	237	68.9 ^a	107	31.1 ^b

Nota: Letras diferentes (a, b) en las filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a la prueba diferencia de proporciones.

En la Tabla 3.2 se muestra la viabilidad según morfología de ovocitos desvitrificados. Se vitrificaron 344 ovocitos de calidad A y B en el criotop, de los cuales se obtuvo el 68.9% de ovocitos viables, mientras que no viables el 31.1%. Se encontró que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a la viabilidad luego de la desvitrificación. Al respecto, diversos autores explican algunas causas de los efectos de la vitrificación sobre los ovocitos; provocan daño estructural irreversible en la membrana del ovocito (Arav y Zeron, 1997), alteran el huso con las consecuentes alteraciones de los cromosomas en los ovocitos en metafase II (Hochi et al., 1998; Albarracín et al., 2005), alteran la distribución de los gránulos corticales o la distribución de los filamentos de actina (Saunders y Parks, 1999). El análisis ultra estructural reveló daños significativos dentro del citoplasma, se observó que los perfiles de expresión génica no se vieron afectados por la vitrificación (Sprícigo et al., 2014). Esto explica por qué en forma global nuestros resultados alcanzan un 68.9% de viabilidad pos vitrificación.

Nuestros resultados son superiores a lo reportado por Zárata (2006) quien obtuvo un 9 % de viabilidad a la evaluación morfológica post vitrificación. Esto pudo ser debido a la complejidad de lograr el estiramiento adecuado de la pajilla 0.25 ml (OPS), por lo que el volumen del medio de vitrificación cargado en la pajilla fue variable. Sin embargo nuestros resultados son inferiores a lo

reportado por Micenyk et al., (2019) quienes obtuvieron 81.25% de supervivencia de ovocitos bovinos luego de la vitrificación, estos autores realizaron la vitrificación en criotubos sin contacto directo con el nitrógeno líquido.

3.3. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE OVOCITOS BOVINOS MEDIANTE LA TINCIÓN VITAL

Tabla 3.3. Viabilidad mediante tinción vital de ovocitos desvitrificados de bovinos criollos del Matadero de Quicapata. Ayacucho 2018.

Grupos Experimentales	Tinción Vital				Total	
	Vivos		Muertos		N°	%
	N°	%	N°	%		
Control	105	86.8 ^a	16	13.2 ^a	121	100.0
Desvitrificados	39	60.9 ^b	25	39.1 ^b	64	100.0

Nota: Letras diferentes (a,b) en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a la prueba diferencia de proporciones.

En la Tabla 3.3 se observa la viabilidad de los ovocitos luego de la tinción vital con azul de tripan, en el grupo control se obtuvo 86.8% ovocitos vivos y 13.2% de ovocitos muertos frente al grupo de los desvitrificados donde se obtuvo 60.9% ovocitos vivos y 39.1% de ovocitos muertos en cuyos resultados se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$).

Esto pudo suceder debido al porcentaje de crioprotector utilizado tal como lo demuestra Gomes et al. (2010) Quien comparó tres concentraciones del crioprotector etilenglicol; 1, (7.5% y 15%); 2, (10% y 20%) y 3, (20% y 40%) cuál indica que obtuvo mejores resultados con el protocolo de 20% y 40% de etilenglicol en dos soluciones de vitrificación haciendo un total de ovocitos viables

62.4%, debido a que produce menores alteraciones en la morfología pos desvitrificación de los ovocitos bovinos inmaduros.

Por otro lado Vajta et al. (1998) realizó un estudio donde los ovocitos que fueron divididos en 2 grupos. En el primer grupo los ovocitos fueron colocados en una concentración de 7.5% de etilenglicol y 7.5% de DMSO durante 3 minutos y después pasaron a un medio de vitrificación de 16.5% etilenglicol y 16.5% DMSO durante 25 segundos; en el segundo grupo la concentración de crioprotector fue en la solución de equilibrio de 10% tanto de etilenglicol y 10% DMSO, permaneciendo en dicha solución 30 a 45 segundos y en la solución de vitrificación con 20% tanto de etilenglicol y DMSO no fue más de 25 segundos dando como resultados una tasa de fertilización de 47% para el primer grupo y 50% para el segundo grupo. Gupta et al. (2002) utilizaron el AT en ovocitos de búfalo, concluyeron que la exposición durante 2 minutos resulta la más adecuada. No se obtienen diferencias significativas en la división celular y embriones desarrollados lo cual indica que el AT no tiene efectos adversos en la maduración y desarrollo a mórulas compactas.

3.4. MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS DESVITRIFICADOS

Tabla 3.4. Maduración *in vitro* de ovocitos desvitrificados procedente de bovinos criollos del Matadero de Quicapata. Ayacucho 2018.

Grupo	Maduración <i>in vitro</i>				Total	
	Madurados		N° Madurados			
	N°	%	N°	%	N°	%
Control	463	89.0 ^a	57	11.0 ^a	520	100.0
desvitrificación	110	58.8 ^b	77	41.2 ^b	187	100.0

Nota: Letras diferentes (a, b) en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a la prueba diferencia de proporciones.

En la Tabla 3.4, se observa que luego de la desvitrificación se obtuvo 58.8% de MIV y en el grupo control 89.0%, existen diferencias significativas ($p < 0.05$), claramente la maduración fue afectada por la exposición de los ovocitos a la vitrificación el cual dañó la viabilidad de los ovocitos y provocó una posterior disminución de la maduración.

Nuestros resultados fueron superiores a lo reportado por Sprícigo et al. (2014) quienes obtuvieron en el grupo control (80%) y el grupo vitrificado (44%), Este autor concluyó que la degeneración del citoplasma parece ser la forma más grave de daño causado por la vitrificación.

Rodríguez et al., (2004) obtuvo luego de la vitrificación de ovocitos bovinos una tasa de maduración de 39.61% frente al grupo control que fue 52.75%, evidenciando que el proceso de criopreservación afectó la capacidad de los ovocitos vitrificados en estadio de VG para reiniciar la progresión meiótica hasta MII. Tan solo un 2,77% de los ovocitos analizados presentaron un huso meiótico de morfología normal; las anomalías incluían en su mayoría ovocitos con ausencia de núcleo, material nuclear degenerado, como también husos dispersos, cromosomas formando un apretado grupo poco definidos. La presencia de un huso meiótico estructuralmente organizado es un requisito necesario y esencial para la formación de embriones tras la fecundación.

Tabla 3.5. Niveles de expansión de las células del cúmulo de ovocitos desvitrificados post maduración *in vitro* procedente de bovinos criollos del Matadero de Quicapata. Ayacucho 2018.

Niveles de expansión de las células del cúmulo	Maduración <i>in vitro</i>			
	Vitrificados		Control	
	Nº	%	Nº	%
Expansión Máxima	15	13.6 ^a	222	47.7 ^b
Expansión Media	30	27.3 ^a	198	42.6 ^b
Expansión Leve	54	49.1 ^a	38	8.2 ^b
No Expansión	11	10.0 ^a	7	1.5 ^b
Total	110	100	465	100

Nota: Letras diferentes (a, b) en las filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a la prueba diferencia de proporciones.

En la Tabla 3.5 podemos observar que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a la expansión del cúmulo de los ovocitos que fueron madurados luego de la vitrificación versus el grupo control. Se obtuvo para el grupo control una expansión máxima de 47.7%, expansión media 42.6%, expansión leve 8.2% y no expansión 1.5%, mientras que el grupo de vitrificados se obtuvo expansión máxima 13.6%, expansión media 27.3%, expansión leve 49.1% y no expansión 10.0%. Con respecto a la calidad del ovocito desvitrificado según expansión de las células del cúmulo luego del proceso de MIV no hemos encontrado hasta la actualidad reporte alguno. En la literatura encontramos a Delgado (2017) quien reporta que del total de ovocitos frescos llevados a MIV obtuvo una expansión máxima 57.78%, expansión media 17.08%, expansión leve 7.68% y no expansión 17.52%. Cuando comparamos nuestros resultados con el grupo control, si sumamos los de expansión máxima y media resulta superior (90.3%) a lo reportado por Delgado (2017).

Algunos autores han evaluado el grado de expansión del cúmulo celular cuando sometieron los ovocitos a un medio de maduración *in vitro* con suero fetal (SFB) bovino y hormonas hipofisarias (FSH, LH, TSH). Así Olson et al. (1990) utilizaron SFB y FSH obteniendo un 64% de expansión máxima; en similitud Younis y Rrackett, (1992) indicaron que el medio de maduración suplementado con SFB + TSH (hormona estimulante del tiroides) permitió lograr un 64% de expansión máxima. Nuestros resultados del grupo control son inferiores a lo reportado por estos dos autores.

En general, podemos concluir que el proceso de vitrificación – desvitrificación de ovocitos bovinos es viable aunque podemos obtener tasas distintas según el indicador de viabilidad.

Así, del total de ovocitos sometidos a vitrificación – desvitrificación se encontró un 68.9% de viabilidad según la morfología (ovocitos sobrevivientes y buenos), y de 31.1% no viables (no sobrevivientes, rotos, denudados, retenidos en los criotop); mientras que mediante tinción vital (0.05% azul tripan) obtuvimos un 60.9% de viabilidad. Estos ovocitos (vitrificados – desvitrificados) llevados al proceso de MIV obtuvimos un 58.8% de maduración. Mientras que si clasificamos estos ovocitos según expansión del cúmulo encontramos un 40.9% de expansión en los grados máximo y medio.

Por lo tanto, la vitrificación de ovocitos, aun cuando es un proceso tóxico para la célula que se podría mejorar en el futuro, viene a constituir una alternativa para la conservación del gameto femenino de bovinos criollos para Ayacucho.

CONCLUSIONES

1. La viabilidad según morfología de ovocitos sometidos al proceso vitrificación-desvitrificación obtenida fue de 68.9%.
2. La viabilidad mediante tinción vital de ovocitos sometidos al proceso vitrificación-desvitrificación obtenida fue de 60.9%, mientras que respecto al grupo control 86.8% ($p<0.05$).
3. En cuanto a la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos sometidos al proceso vitrificación-desvitrificación obtenida fue 58.8%, mientras que el grupo control 89% ($p<0.05$).
4. En la evaluación de la calidad del ovocito desvitrificado y sometido a MIV según el grado de expansión del cúmulo se encontró diferencias entre el grupo vitrificado y el grupo control ($p<0.05$) con 40.9 % y 90.3% respectivamente, para los grados de expansión máxima y media, considerados como óptimos para continuar con el proceso de fertilización *in vitro*.

RECOMENDACIONES

1. Realizar trabajos de vitrificación según edad o etapa reproductiva de las vacas.
2. Realizar trabajos de crioconservación según caracterización fenotípica y genotípica de bovino criollo ayacuchano.
3. Realizar trabajos de evaluación del efecto de la vitrificación de ovocitos bovinos en el desarrollo embrionario.
4. Realizar trabajos de vitrificación de ovocitos antes y después del proceso de maduración *in vitro*.
5. Para la valoración de la viabilidad pos vitrificación utilizar tinciones más específicas como la prueba de TUNEL, tinte fluorescente o similares.
6. Para la valoración de la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos realizar tinciones como; tinción con lacmoide, espectrometría de masas de lípidos, la tinción con MitoTracker verde, microscopía electrónica de transmisión y microfluorometría.
7. Realizar trabajos de criopreservación de gametos bovinos criollos y así crear bancos de germoplasma de acuerdo a ecotipos del vacuno criollo ayacuchano.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Albarracín J, R Morató, C Rojas, T Mogas. (2005). Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of *in vitro* matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology* 63, 890-901.
- Arav, A. y Zeron. (1997). Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is affected by the composition and concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology* 47, 341.
- Arlotto T., Schwartzj, L., First, N.L y Leibfried M.L. (1996) Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45: 943-956.
- Armstrong, D. T., Zhang, X., Vanderhyden, B. C., & Khamsi, F. (1991). Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization and early embryonic development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 626, 137-158.
- Baker Y. Franchi. 1967. The Fine structure of chromosomes in bovine primordial oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 513 p.
- Baker, T. 1982. Oogenesis and ovulation. *Reproduction in mammals*. Editado por Austin R. Short, Cambridge: Cambridge university press. p 14-45.
- Block, J., Hansen, P. J., Loureiro, B. y Bonilla, L. (2011). Improving post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*: actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology*, 76(9), 1602-1609.
- Byskov, A. (1982) Primordial germ cells and regulation of meiosis. En: *Reproduction in mammals*, editado por C. Austin, R. Short. Cambridge: Cambridge University Press, p. 1-16.
- Calvo J., Deborah R., Mónica V. y Paula L., (2015). Vitrified and *in Vitro* Matured Oocytes Viability from Adult Housecat (*Felis catus*) in Reproductive Season *Int. J. Morphol.* vol.33 no.4 Temuco dic.
- Carolan C., Monaghan P.,Gallagher.M.,Gordon.I.,(1994) Effect of recovery method of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology*, 41: 1061-1068

- Cha, K. Y., Chung, H. M., Lim, J. M., Ko, J. J., Han, S. Y., Choi, D. H., y Yoon, T. K., (2000). Freezing immature oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 169(1-2), 43-47.
- Critser J, Agca Y and Gunasena K. (1997). The criobiology of mammalian oocytes. In: karrow A, Critser J, editors. Reproductive tissue banking. San diego: Academic Press. Pp 332 – 358.
- De Loos, F., Van Maurik, T. Van Beneden Y Kruij. (1992). Stmctural Aspeas Ofbovine Oocyte Maturation *In Vitro*. *Mol. Reprod. Dey.* 31: 208-214.
- Delgado, R. (2017). Maduración *in vitro* de ovocitos en metafase II de vacas post mortem a través de la técnica de fijación.
- Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D. F., Aalberg, J., & Rangarajan, S. (1988). Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Developmental biology*, 130(1), 184-197.
- Eroglu, A., Toner, M., Leykin, L. y Toth, TL (1998). Citoesqueleto y poliploidía después de la maduración y fertilización de la vesícula germinal criopreservada: ovocitos de ratón en etapa. *Revista de reproducción asistida y genética*, 15 (7), 447-454.
- Fabbri, R., Porcu, E., Marsella, T., Primavera, MR, Rocchetta, G., Ciotti, PM y Flamigni, C. (2000). Aspectos técnicos de la criopreservación de ovocitos. *Endocrinología molecular y celular*, 169 (1-2), 39-42.
- Fabbri, R., Porcu, E., Marsella, T., Rocchetta, G., Venturoli, S., & Flamigni, C. (2001). Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Human reproduction*, 16(3), 411-416.
- Fernández F., J.E. Hernández P, Gabriela C. (2012). Viability Of *In Vitro* Immature And Matured Pig Oocytes Vitriified With Ethylen Glycol And Trehalose *Rev Salud Anim.* vol.34 no.1 La Habana ene.-abr.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., & Navarro, P. A. A. S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71(5), 836-848.
- Florman, H., Ducibella, T. (2006). Fertilization in Mammals. En *The Physiology of Reproduction*, Knobil and Neill. Edited by Neill, J., Third edition. Elsevier. Academic Press, USA. 2: 56-75.

- Franchi LL, Mandl AM. (1962). La ultraestructura de la oogonia y los ovocitos en la rata fetal y neonatal. *Proc R Soc London B* 157: 99–114.
- Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus GJ, Downey BR. (1992). *In vitro* fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*; 29:485–492.
- Gómez J., Restrepo B. G., & Vásquez N. (2010). Efecto del etilenglicol sobre la morfología post-desvitrificación de oocitos bovinos inmaduros. *Revista Lasallista de Investigación*, 7(1).
- Gondos B. (1978). Oogonia and oocytes in mammals. En: the vertebrata ovary, editado por R. Jones, New York plenum press, p. 83-120.
- Gordon, I., Y Lu, H. (1990). Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*, 33: 77-87
- Gordon, I. (2003) Laboratory production of cattle embryos. Editorial CABI Publishing, Second Edition, USA.
- Gordon, I. (2004) Tecnología de la reproducción de los animales de granja, editorial Acribia, España.
- Gupta, P.S.P., Ravindranatha, B.M., Nandi, S. and Sarma, P.V. (2002). Trypan blue staining to differentiate live and dead buffalo oocytes and its effect on embryo development *in vitro*. National Institute of Animal Nutrition and Physiology. Bangalore. Karnataka.
- Hafez E. (1996). Reproduccion e Inseminacion artificial en Animales. Mc Graw Hill Interamericana, DF. Mexico. 542 pp.
- Hochi S, Maruyama K, Oguri N. (1998). Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. *Theriogenology*, v.46, p.1217-1224.
- Hyttel, P. (1988) Oocyte maturation and fertilization in cattle. Ultrastructural aspects. Tesis doctoral. The Royal VeteriNary and Agricultural University. Copenhagen.
- Hyttel, P., Xu, KP, Smith, S. y Greve, T. (1986). Ultraestructura de la maduración *in vitro* de ovocitos en bovinos. *Reproducción*, 78 (2), 615-625.
- INEI. Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2012). III Censo Nacional Agropecuario: Resultados Definitivos, Departamento de Ayacucho. Tomo II. p 152-203. Lima. Perú.

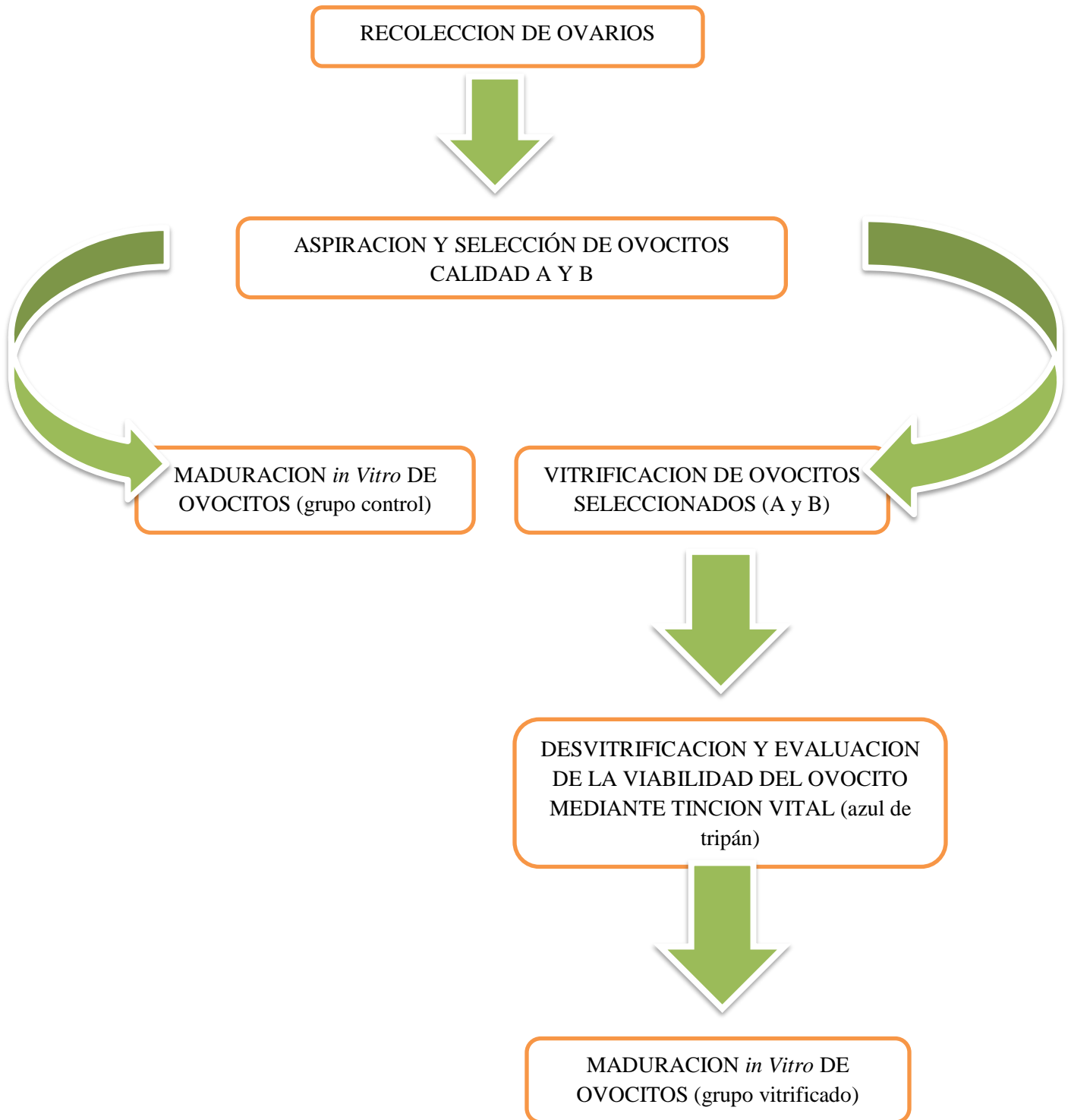
- Isachenko V, C Soler, E Isachenko, F Pérez-Sánchez, V Grishchenko. (1998). Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipids droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 36, 250-253.
- Jewgenow, K. and Stolte, M. (1996). Isolation of preantral follicles from nondomestic cats viability and ultrastructural investigations. *Anim Reprod Sci*, 44: 183-193.
- Kato, Y. and Tsunoda, Y. (1996). Low temperatura preservation of mouse fetal germ cells at 4°C. *Theriogenology*, 45: 1029-1035.
- Kuleshova, LL, Macfarlane, DR, Trounson, AO y Shaw, JM (1999). Los azúcares ejercen una gran influencia en las propiedades de vitrificación de las soluciones basadas en etilenglicol y tienen baja toxicidad para los embriones y los ovocitos. *Cryobiology*, 38 (2), 119-130.
- Leibfried L. and First N. L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48: 76 – 83.
- Leibfried M.L., Critser E.S. Parrish J.L, Fist N.L. (1989) *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31: 6174
- Lewin, A., Tal, Z., Zohav, E. and Schenker, J.G. (1990). Ultrarapid freezing and thawing of hámster oocytes: morphological parameters, trypan blue staining and sperm penetration assay for evaluating survival. *J Reprod Med*, 35: 136-140.
- Lonergan P., Vergos E., Kinis A., Sharif H., Gordon I. (1991). The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for IVM. *Theriogenology*, 35: 231.
- Lorenzo, G. (1992). Maduración *in vitro* de oocitos de ganado vacuno. Universidad complutense de Madrid. Facultad de veterinaria. Departamento de fisiología animal. Tesis Doctoral. Madrid.
- Magistrini M., Szollosi D. (1980). Effects of cold and of isopropyl N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocyte. *Eur. J. Cell. Biol*, 22: 6999 – 707.
- Massip, A. (2003) Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. *Reprod Nutr Dev*. 43:325.
- Mazur, P. (1984). Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mamalian ova and embryos. *Anim. Repr. Sci*. 28: 239-245.
- McWilliams R.B., Gibbons W.E., Leibo S.P. (1995). Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono-and disaccharides. *Human Reproduction*, 10(5), 1163-1171.

- Micenyk, AC, Gelm, YV, y Abakushina, EV (2019, marzo). Desarrollo de las condiciones óptimas para la vitrificación de complejos de cúmulos-ovocitos de mamíferos. En *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1189, No. 1, p. 012036). IOP Publishing.
- Miyake, T., M. Kasai, S. E. Zhu, T. Sakurai, T. Machida. (1993). Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylen based solution by a simple method. *Theriogenology* 40: 121-134.
- Olson, S.E., A. Romero, W.K. Thomas Y O.E. Seidel, (1990). Effects of FSH and heparin on *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 33: 293.
- Parks, J. E., & Ruffing, N. A. (1992). Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37(1), 59-73.
- Rodríguez T., Molina, J. B., & Monreal, P. C. V. (2004). Sobrevivencia morfológica y progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados. *Ciencia*, 12(2).
- Rojas C, Palomo JM, Albarracin JL, Mogas T. (2004). Vitrification of immature pig oocytes: Study of distribution of chromosomes, microtubules and actin microfilaments. *Cryobiology*. 49: 211-220.
- Sulca L, (2016). Viabilidad post descongelación de ovocitos en bovinos criollos según diámetro folicular ayacucho 2750 m.s.n.m.
- Saunders KM, JE Parks. (1999). Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 61, 178-187.
- Seneda M., Esper, C., Garcia, J., Oliveira, A., Vantini R. (2001). Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, 67: 37-43
- Shaw, J., Oranratnachai, A., Trouson A. (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53: 59-72.
- Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N., Hosseini, SM y Karimi, I. (2007). La presencia de células cúmulos en la maduración nuclear de ovocitos de oveja durante la maduración *in vitro*. *Investigación en pequeños rumiantes*, 68 (3), 291-295.
- Sommerfeld, V., H. Niemann, (1999). Cryopreservation of bovine *in vitro* Produced Embryos Using Ethylenglicol in Controlled Freezing or Vitrification. *Cryobiology* 38: 95-105.

- Sprícigo, J., Morais, K., Ferreira, A. R., Machado, G., Gomes, A., Rumpf, R. & Dode, M. (2014). Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: assessment of morphological, molecular and functional patterns. *Cryobiology*, 69(2), 256-265.
- Vajta G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science* 60–61: 357–364
- Vajta, G., P. Holm, M. Kuwayama, P.J. Booth, H. Jacobsen, T. Greve, H. Callesen. (1998). Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoijuries of bovine ova and embryos. *Molec. Reprod. And Dev.*51: 53-58.
- Zarate, O. (2006). Comparción de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos. Veracruz - Mexico: Universidad de Veracruz. págs 6.
- Zuckermann S. (1962). The ovary. Vol I. New York: Academic Press.
- Zuelke, K. A., Brackett, B.G. 1990. Luteinizing hormone enhanced in vitro development of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Rep. Dev.* 31: 72 - 77.

ANEXO

ANEXO N° 1. Diagrama de vitrificación y maduración de ovocitos bovinos criollos.



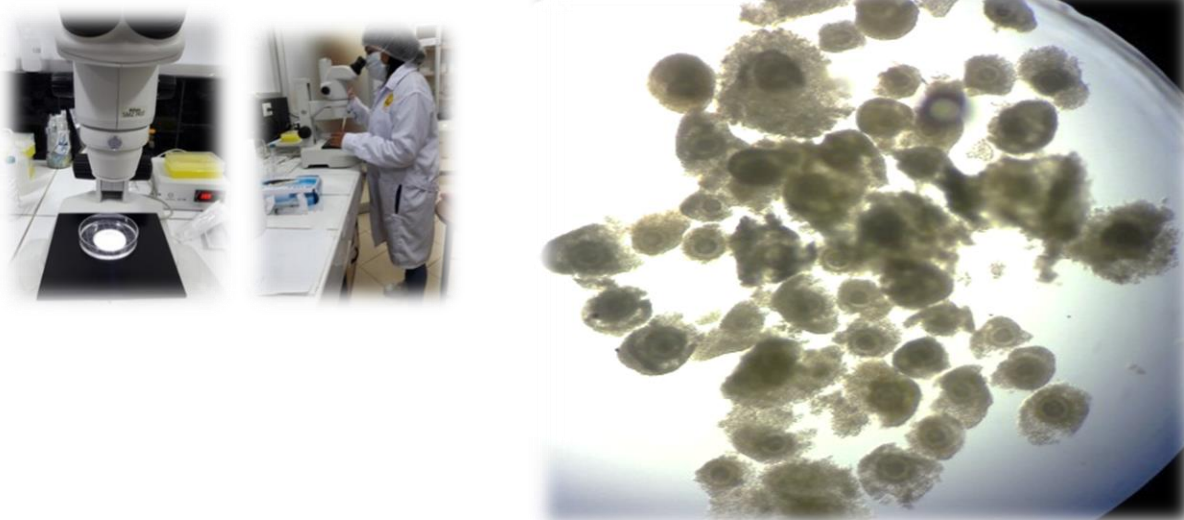
ANEXO 2. Preparación de los medios de manipulación, vitrificación y maduración *in vitro*.



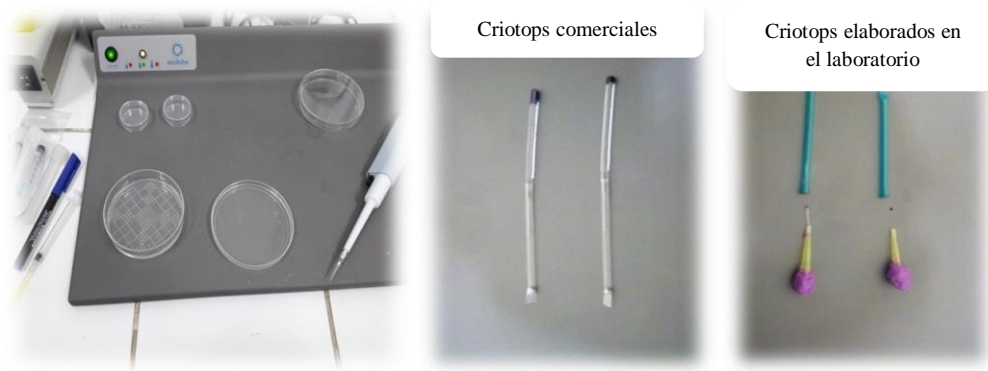
ANEXO 3. Colecta de ovarios de bovinos criollos del matadero de Quicapata.



ANEXO 4. Selección de los ovocitos bovinos criollos luego de la aspiración folicular y sedimentación del líquido folicular (ovocitos de tipo A y B)



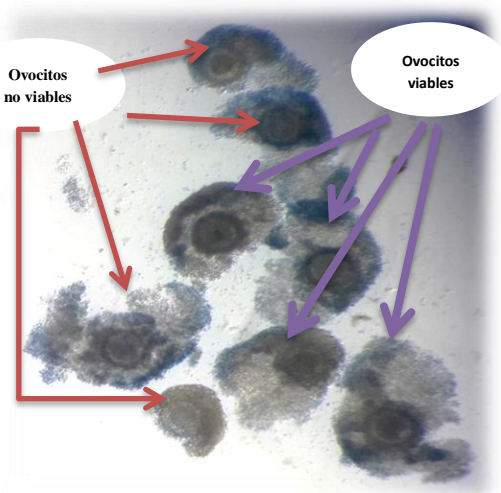
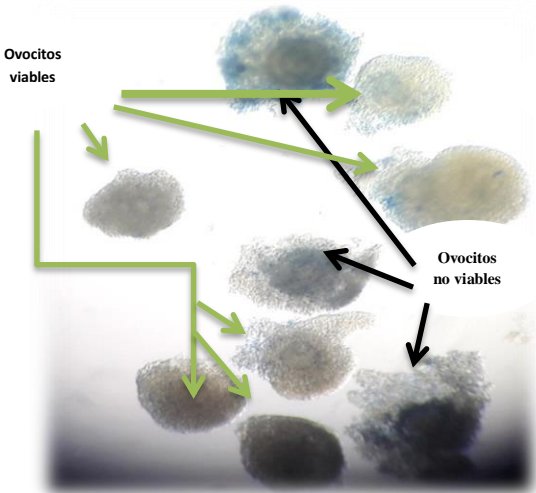
ANEXO 5. Materiales para la vitrificación de ovocitos obtenidos a partir de ovarios de bovinos criollos.



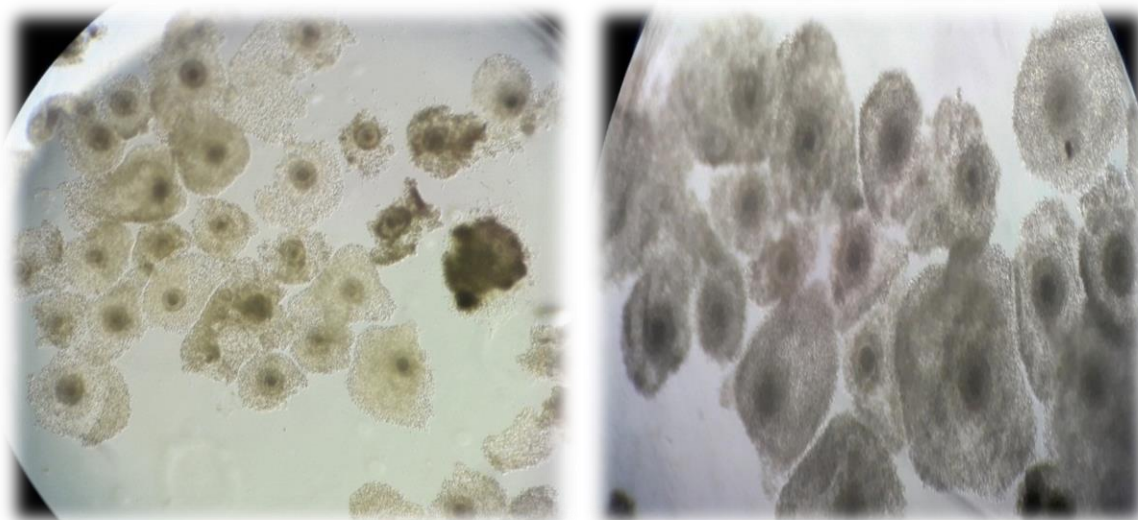
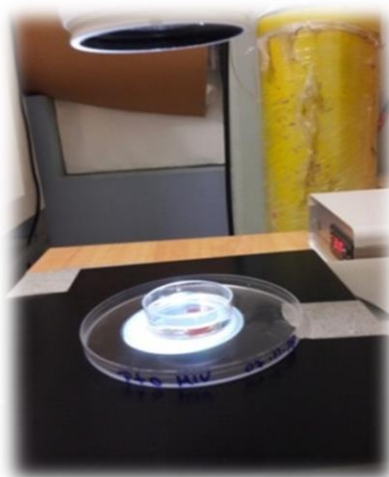
ANEXO 6. Proceso de Vitrificación de los ovocitos obtenidos a partir de ovarios de bovinos criollos (ovocito tipo A y B).



ANEXO 7. Proceso de tinción por exclusión azul de tripán de ovocitos obtenidos a partir de ovarios de bovinos criollos.



ANEXO 8. Proceso de Maduración *in vitro* de ovocitos obtenidos a partir de ovarios de bovinos criollos luego de la vitrificación.



ANEXO 9. Preparación de solución salina 0.9%

INSUMOS	CANTIDAD (1L)
Agua bidestilada	9g
Gentamicina	1L
Agua bidestilada	1 ml

ANEXO 10. Preparación de medio de manipulación.

INSUMOS	CANTIDAD
NaCl	30 ml
Suero fetal bovino	3 ml
gentamicina	3 µl

ANEXO 11. Preparación de medio de vitricación y desvitrificación.

INSUMOS	CANTIDAD
Etilen glicol	7.5% (equilibrio)
Dimetilsulfoxido (DMSO)	7.5% (equilibrio)
Etilen glicol	15% (vitrificante)
Dimetilsulfoxido (DMSO)	15% (vitrificante)
Sucrosa	0.5M (vitrificante)

FUENTE: Spricigo et al., (2014)

ANEXO 12. Preparación de medio maduración *in vitro*.

INSUMOS	CANTIDAD
TCM_199	9 ml
SFB	1 ml
Piruvato	20 µl
FSH-LH	50 µl

Glutamina	60 µl
EGF	10 µl
Estradiol	10 µl
Gentamicina	10 µl

FUENTE: Spricigo et al., (2014)

ANEXO 13. Procedimiento estadístico

1. Diferencia de proporciones entre ovocitos pre vitrificados vs ovocitos post vitrificados:

> pre vs post vitrificados < -c (237,107)

> Total < -c (344,344)

	1
2	<2e-16

Método de ajuste del valor P: bonferroni

2. Diferencia de proporciones para la vitalidad de ovocitos control vs postvitrificación:

>tinción vital < -c (105,39)

> Total < -c (121,64)

	1
2	0.00012

Método de ajuste del valor P: bonferroni

3. Diferencia de proporciones para maduración de ovocitos control vs maduración de ovocitos postvitrificación:

> Maduración ovocitos < -c (463,110)

> Total < -c (520,187)

	1
2	<2e-16

Método de ajuste del valor P: bonferroni

4. Diferencia de proporciones entre ovocitos pre vitrificados vs ovocitos post vitrificados:

> pre vs post vitrificados < -c (237,107)

> Total < -c (344,344)

	1
2	<2e-16

Método de ajuste del valor P: bonferroni

4. Diferencia de proporciones niveles de expansión de las células del cumulo Minitab®

17.1.0

Prueba e IC para dos proporciones			
Muestra	X	N	Muestra p
1	15	110	0.136364
2	222	465	0.477419

Diferencia = p (1) - p (2)

Estimación de la diferencia: -0.341056

IC de 95% para la diferencia: (-0.419630; -0.262482)

Prueba para la diferencia = 0 vs. ≠ 0: Z = -8.51 Valor p = 0.000

Prueba exacta de Fisher: Valor p = 0.000

Prueba e IC para dos proporciones			
Muestra	X	N	Muestra p
1	30	110	0.272727
2	198	465	0.425806

Diferencia = p (1) - p (2)

Estimación de la diferencia: -0.153079

IC de 95% para la diferencia: (-0.247666; -0.0584929)

Prueba para la diferencia = 0 vs. $\neq 0$: $Z = -3.17$ Valor $p = 0.002$

Prueba exacta de Fisher: Valor $p = 0.003$

Prueba e IC para dos proporciones			
Muestra	X	N	Muestra p
1	54	110	0.490909
2	38	465	0.081720

Diferencia = $p(1) - p(2)$

Estimación de la diferencia: 0.409189

IC de 95% para la diferencia: (0.312505; 0.505872)

Prueba para la diferencia = 0 vs. $\neq 0$: $Z = 8.30$ Valor $p = 0.000$

Prueba exacta de Fisher: Valor $p = 0.000$

Prueba e IC para dos proporciones			
Muestra	X	N	Muestra p
1	11	110	0.100000
2	7	465	0.015054

Diferencia = $p(1) - p(2)$

Estimación de la diferencia: 0.0849462

IC de 95% para la diferencia: (0.0278017; 0.142091)

Prueba para la diferencia = 0 vs. $\neq 0$: $Z = 2.91$ Valor $p = 0.004$

Prueba exacta de Fisher: Valor $p = 0.000$