

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
AGRARIAS**



**TESIS:**

**Validar el efecto de dos métodos de crioconservación de  
ovocitos bovinos criollos sobre el desarrollo *in vitro* de  
embriones. Ayacucho a 2750 msnm - 2018**

Para optar el grado académico de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS, MENCIÓN EN  
SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTADO POR:

**Bach. Lizbeth JANAMPA SERRANO**

ASESOR:

**Dr. Luis Arturo RODRÍGUEZ ZAMORA**

**AYACUCHO - PERÚ**

**2025**

## DEDICATORIA

*A mi madre Susana Serrano Tomaylla por su gran amor invaluable, sacrificio, esfuerzo y dedicación permanente; para conseguir mis metas e ideales; y es el motivo para continuar escalando como profesional.*

*A la adorada memoria de mi abuelita Apolonia Tomaylla Alfaro, gracias por tu amor y las bendiciones que me envías desde lo alto, para continuar escalando.*

*A mis hermanas Susan y Karina, por el apoyo incondicional con sus consejos, motivación y cariño, me dieron las fuerzas para llegar a este triunfo.*

*A mis hijos Patrick y Evans por ser el motor y el motivo de mis actos. Y a mi esposo por su cariño.*

## **AGRADECIMIENTO**

A la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga – Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias - Mención en Salud y Producción Animal, por ofrecerme la formación profesional de Maestra.

Al Laboratorio de Reproducción y Biotecnología Animal de la Escuela de Medicina Veterinaria- Facultad de Ciencias Agrarias- Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, por haberme brindado todas las facilidades necesarias para llevar a cabo el desarrollo de mi trabajo de investigación.

Al Matadero de Quicapata por brindarme las instalaciones y facilidades, para la recolección de la población de ovarios y por consiguiente la obtención de muestras para dar el inicio el estudio del trabajo de investigación.

Al Dr. Arturo Rodríguez Zamora, por su acertada labor de asesorar en el presente trabajo de investigación, la orientación profesional y el tiempo dedicado al mismo.

A mis docentes, quienes durante mis años de permanencia en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias en mención Salud y Producción Animal; por haber brindado sus conocimientos y experiencias. Mi más sincero agradecimiento.

A mi hermana Susana Aracely por su apoyo incondicional en todo aspecto, con sus consejos, motivación, quien me dio fuerzas para llegar al éxito.

A mis buenos amigos, Susan, Yuvan, José, Mijaíl, Alfredo, Yuly, por todos los momentos inolvidables que hemos pasado en el transcurso de la formación de posgrado y en la elaboración del trabajo y a todas las personas que han contribuido en mi formación personal y formación de posgrado. Les doy las gracias.

## ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTO .....	iii
ÍNDICE .....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	ix
RESUMEN .....	x
ABSTRACT .....	xii
INTRODUCCIÓN .....	1
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
II. MARCO TEÓRICO .....	5
2.1. Antecedentes .....	5
2.2. Bases teóricas .....	11
2.2.1. <i>Bovino criollo en el país</i> .....	11
2.2.2. <i>Obtención de ovarios y ovocitos</i> .....	12
2.2.3. <i>Obtención de los ovocitos</i> .....	13
2.2.4. <i>Componentes de los medios de cultivo</i> .....	15
2.2.5. <i>Agentes crioprotectores</i> .....	17
2.2.7. <i>Técnicas de criopreservación de ovocitos</i> .....	18
2.2.8. <i>Vitrificación de ovocitos</i> .....	21
2.2.9. <i>Vitrificación y desvitrificación</i> .....	22
2.2.10. <i>Sistema de producción in vitro de embriones</i> .....	23
III. METODOLOGÍA .....	27
3.1. Ubicación del trabajo .....	27
3.1.1. <i>Trabajo de laboratorio</i> .....	27
3.1.2. <i>Trabajo de campo</i> .....	27
3.1.3. <i>Tamaño de muestra</i> .....	27

3.2. Materiales de estudio .....	27
3.2.1. <i>Material biológico</i> .....	27
3.2.2. <i>Material físico</i> .....	28
3.2.3. <i>Insumos</i> .....	28
3.3. Procedimiento metodológico .....	29
3.3.1. <i>Obtención de ovarios y recuperación de ovocitos</i> .....	29
3.3.2. <i>Congelación lenta y descongelación de ovocitos</i> .....	30
3.3.3. <i>Vitrificación y desvitrificación de ovocitos</i> .....	33
3.3.4. <i>Maduración in vitro (MIV) de ovocitos</i> .....	35
3.3.5. <i>Evaluación de la madurez ovocitaria post cultivo in vitro</i> .....	36
3.3.6. <i>Capacitación espermática y fertilización in vitro (FIV)</i> .....	36
3.3.7. <i>Cultivo embrionario in vitro</i> .....	38
3.3.8. <i>Evaluación de los estadios de desarrollo y calidad embrionaria</i> ....	39
3.4. Análisis estadístico .....	41
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
4.1. Maduración ovocitaria <i>in vitro</i> (MIV) .....	43
4.1.1. <i>Maduración por congelación lenta</i> .....	44
4.1.2. <i>Maduración por vitrificación</i> .....	45
4.2. Clivaje al tercer día (tc3d) y al quinto día (tc5d) .....	49
4.2.1. <i>Clivaje por congelación lenta</i> .....	49
4.2.2. <i>Clivaje por vitrificación</i> .....	51
4.3. Calidad de blastocistos (tcb).....	54
4.3.1. <i>Tasa y calidad de blastocistos por congelación lenta</i> .....	54
4.3.2. <i>Tasa y calidad de blastocistos por vitrificación</i> .....	55
4.4. Eficacia de los métodos de criopreservación sobre los embriones viables ..	57
.....	57
V. CONCLUSIONES.....	59
VI. RECOMENDACIONES.....	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS.....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1</b> Tasa de maduración de ovocitos bovinos criollos criopreservados en congelación lenta y vitrificación. Ayacucho .....	43
<b>Tabla 2</b> Tasa de clivaje de ovocitos inmaduros bovinos criollos expuestos a congelación lenta y vitrificación. Ayacucho .....	49
<b>Tabla 3</b> Tasa de calidad de blastocisto de ovocitos bovinos criollos criopreservados en congelación lenta y vitrificación. Ayacucho .....	54
<b>Tabla 4</b> Eficacia de los blastocistos viables criopreservados en congelación lenta y vitrificación. Ayacucho .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1</b>	I. Ovocitos rodeados de 6 capas de células de cúmulus, II. Ovocitos rodeados de 2 capas de células de cúmulus, III. Ovocitos con pocas células de cúmulus, IV. Ovocitos desnudos..... 14
<b>Figura 2</b>	Ovocitos con cúmulus expandido después de 24 h. de la maduración ..... 14
<b>Figura 3</b>	Esquema de las partes de una pajilla .....20
<b>Figura 4</b>	Diagrama representativo de las rampas de enfriamiento.....22
<b>Figura 5</b>	Ovocitos obtenidos de MIV .....24
<b>Figura 6</b>	Embriones en clivaje .....25
<b>Figura 7</b>	Blastocisto al día 7 .....26
<b>Figura 8</b>	Manejo de ovarios y obtención de ovocitos .....30
<b>Figura 9</b>	Proceso de congelación y descongelación.....33
<b>Figura 10</b>	Vitrificación y desvitrificación de ovocitos .....35
<b>Figura 11</b>	Proceso de maduración in vitro de ovocitos .....36
<b>Figura 12</b>	Fertilización in vitro .....37
<b>Figura 13</b>	Cultivo de embriones .....38
<b>Figura 14</b>	Evaluación del desarrollo embrionario.....39
<b>Figura 15</b>	Ovocito degenerado a 100x .....40
<b>Figura 16</b>	Embrión degenerado, presencia de vacuola .....40

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
<b>Gráfico 1</b> Proceso de congelación lenta de ovocitos .....	32
<b>Gráfico 2</b> Proceso de vitrificación de ovocitos .....	34

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo 1.</b> Matriz de Consistencia .....	72
<b>Anexo 2.</b> Proceso de producción de blastocistos por congelación lenta y vitrificación .....	73
<b>Anexo 3.</b> Proceso de elaborar la parte estadística del trabajo .....	74
<b>Anexo 4.</b> Procesamiento estadístico. Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples (MIV) .....	75
<b>Anexo 5.</b> Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples (FIV).....	77
<b>Anexo 6.</b> Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples (CIV) .....	79
<b>Anexo 7.</b> Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples ( <b>tc3d</b> ).....	82
<b>Anexo 8.</b> Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples ( <b>tc5d</b> ).....	85
<b>Anexo 9.</b> Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples ( <b>tbv</b> ).....	87
<b>Anexo 10.</b> Prueba de la mínima diferencia significativa ( <b>tbv</b> ).....	89
<b>Anexo 11.</b> Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples ( <b>tcb</b> ).....	90
<b>Anexo 12.</b> Prueba de la mínima diferencia significativa ( <b>tcb</b> ).....	92
<b>Anexo 13.</b> Cálculo de eficacia de ovocitos vitrificados.....	93
<b>Anexo 14.</b> Cálculo de eficacia de ovocitos congelados .....	93
<b>Anexo 15.</b> Cálculo de eficacia de los métodos de Criopreservación.....	94
<b>Anexo 16.</b> Panel fotográfico .....	94

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto de dos métodos de criopreservación de ovocitos sobre el desarrollo *in vitro* de embriones provenientes de bovinos criollos, de esta manera se pretende contribuir en la preservación de la genética criolla por sus atribuciones de resistencia, rusticidad y resiliencia frente al medio alto andino y enfrentar desafíos futuros al cambio climático como sequía, calor y otras adversidades. Para lo cual, fueron colectados ovarios de bovinos criollos sin patrón definido de procedencia, ni edad, sacrificados del matadero Quicapata y transportados hacia el Laboratorio de Reproducción y Biotecnología de la EPMV-UNSCH en un medio de transporte a 37°C. Los complejos cúmulos ovocitos (CCOs) fueron obtenidos a través de la aspiración de folículos entre 2 a 6 mm de diámetro y clasificados en categorías A,B,C,D, según las capas de células de la granulosa y la morfología del citoplasma homogéneo. Se trabajó con una muestra de 1319 ovocitos de categoría A y B, que fueron distribuidos al azar en tres grupos para todo el proceso de producción *in vitro* de embriones: G1: ovocitos frescos; G2: ovocitos sometidos a congelación lenta y; G3: ovocitos sometidos a vitrificación. Luego fueron llevado al proceso de maduración *in vitro* - MIV (38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad saturada) por 24 horas, después los ovocitos madurados fueron llevados al proceso de fertilización *in vitro* (FIV) por 18 horas con semen de toro criollo previa capacitación espermática, y finalmente los presuntos cigotos fueron conducidos al proceso de cultivo *in vitro* (CIV) hasta el día siete u ocho. Como resultado para MIV no hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), para G2 y G3 que resultaron 78.6% y 77% respectivamente, pero si comparado con los ovocitos frescos madurados que alcanzaron un 98.2%; mientras al evaluar la

tasa clivaje al tercer día y quinto día, se obtuvo por vitrificación 17.3%, 27.9% semejante a la criopreservación por congelación lenta 14.7%, 19.6%, no existiendo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), en cuanto a la evaluación de la tasa y calidad de blastocistos por vitrificación se logró 20.1%, 18.6%, y por congelación lenta se obtuvo 16.9%, 14.3%, donde no hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Se concluye que, los ovocitos frescos tienen mejores tasas en cada etapa de la producción de embriones *in vitro*, comparado con las dos técnicas de criopreservación. Entre las dos técnicas de criopreservación, encontramos que, aunque la vitrificación muestra una tendencia a ser más eficaz que la congelación lenta, se sugiere que ambos métodos pueden ser utilizados para conservar los ovocitos del ganado tipo criollo de Ayacucho.

**Palabras clave:** vesícula germinal, congelación lenta de ovocitos, vitrificación de ovocitos, producción *in vitro* de blastocistos, crioconservación de recursos genéticos.

## ABSTRACT

The present work aims to determine the effect of two methods of oocyte cryopreservation on the *in vitro* development of embryos from Creole cattle. This will contribute to the preservation of Creole genetics due to their resistance, hardiness and resilience to the high Andean environment and to help them cope with future challenges of climate change such as drought, heat and other adversities. Ovaries were collected from Creole cattle with no defined pattern of origin or age, slaughtered at the Quicapata slaughterhouse and transported to the Reproduction and Biotechnology Laboratory of the EPMV-UNSCH in a transport medium at 37 ° C. Cumulus oocyte complexes (CCOs) were obtained through aspiration of follicles between 2 and 6 mm in diameter and classified into categories A, B, C, D, based on the layers of granulosa cells and the morphology of the homogeneous cytoplasm. A sample of 1319 oocytes from category A and B was relatively distributed into three groups for the entire *in vitro* embryo production process: G1: fresh oocytes; G2: subjected to slow freezing and; G3: subjected to vitrification. Then they were taken to the *in vitro* maturation process - IVM at 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub>, and saturated humidity for 24 hours. After maturation, the oocytes were fertilized *in vitro* (IVF) for 18 hours with semen from a post-capacitation local bull, and finally, the presumed zygotes were cultured *in vitro* (IVC) until day seven or eight. As a result, for IVM there was no significant difference ( $p < 0.05$ ), for G2 and G3 which resulted 78.6% and 77% respectively, compared to matured fresh oocytes that reached 98.2%. When evaluating cleavage rate on the third and fifth days, vitrification yielded 17.3%, 27.9%, similar to slow freezing cryopreservation which resulted in 14.7%, 19.6%, with no significant difference ( $p < 0.05$ ). Regarding the evaluation of the blastocyst rate and quality through vitrification, rates of 20.1% and 18.6% were achieved, while slow freezing obtained 16.9% and 14.3%, where no significant difference ( $p < 0.05$ ) was observed. It is concluded that although vitrification shows a tendency to be more effective than slow freezing, both methods can be used to preserve the genetic material of this breed. However, it is necessary to optimize the cryopreservation conditions to improve the efficacy of the embryos produced *in vitro* compared to those produced with fresh oocytes.

**Keywords:** germinal vesicle, slow oocyte freezing, oocyte vitrification, in vitro blastocyst production, cryopreservation of genetic resources.

## INTRODUCCIÓN

El ganado bovino criollo y su alta adaptabilidad a muchos hábitats lo convierte en una fuente potencialmente valiosa de genes útiles, como genes de resistencia a enfermedades, por lo que cumple tres objetivos como resultado de su naturaleza rústica: carne, productos lácteos y trabajo (Delgado, 2012) especialmente para zonas agrestes alto andinas. Sabiendo que la base de la ganadería en el Perú lo constituye el 63% vacuno criollo (INEI, 2012), esta proporción abarca vacunos criollos que exhiben diversos grados de hibridación con otras razas importadas. Por lo que se estima que el porcentaje de bovino criollos puros se encuentre en una situación bastante menor que debería estudiarse con especial atención.

La criopreservación es importante en la transferencia de embriones porque esta técnica permite conservar ovocitos y embriones durante un tiempo prolongado, lo que facilita su uso en momentos y lugares donde las condiciones son óptimas para lograr la gestación en hembras receptoras (Cabrera & Fernández, 2006).

La crioconservación de células vivas ha permitido conservar material biológico de una amplia gama de animales durante un tiempo infinito sin comprometer su función ni introducir cambios genéticos (Mazur, 1984). Las técnicas de congelación lenta y vitrificación han hecho factible la criopreservación de ovocitos y embriones de algunas especies de mamíferos.

El presente trabajo tiene como objetivo, determinar el efecto de los métodos de criopreservación en el desarrollo *in vitro* de embriones provenientes de ovocitos bovinos criollos, de esta manera se pretende contribuir en la valoración y preservación de esta genética criolla en nuestra sociedad ayacuchana, como estrategia clave para enfrentar desafíos futuros, frente a la amenaza al efecto de cambio climático y como objetivo específico se detalla a continuación.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar la tasa de maduración ovocitaria, de clivaje, de blastocistos y calidad de blastocistos a partir de ovocitos criopreservados mediante efecto de la congelación lenta y vitrificación.
2. Determinar cuál de los dos métodos de crio preservación presenta mayor eficacia para lograr mayores tasas de embriones viables en cuanto a su tinción.

## I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad la diversidad de recursos zoogenéticos en la región andina viene disminuyendo por la rápida expansión de proyectos ganaderos con el componente de mejora genética, donde se prioriza la inseminación artificial con semen Brown Swiss. El calentamiento global supone una amenaza adicional para todos los recursos genéticos, al incrementar la presión sobre la biodiversidad.

A nivel nacional se estima que el Ganado bovino criollo mantenido como puro representa una cifra menor muy preocupante que se encuentra amenazado por ausencia de planes de conservación y que, al someterse a cruzamiento indiscriminado con otras razas, se pierde como material genético puro, por eso es necesario valorar sus amplias propiedades de resistencia, resiliencia y rusticidad al medio alto andino, y conviene mantener este valioso recurso genético para facilitar la adaptación de la ganadería a este ambiente agreste y enfrentar desafíos futuros frente al cambio climático.

Entre las principales técnicas para mantener el material genético, es la criopreservación de células que son almacenadas indefinidamente sin pérdida funcional y sin alteraciones genéticas, por eso la necesidad de investigar cuál de los métodos de criopreservación influyen el desarrollo *in vitro* de embriones provenientes de ovocitos bovinos criollos de Ayacucho.

Por lo tanto, se formula la siguiente interrogante:

¿Cuál es el efecto de los métodos de criopreservación en el desarrollo *in vitro* de embriones provenientes de ovocitos bovinos criollos, y qué técnica de criopreservación resulta ser la más efectiva para conservar el material genético puro?

## **Justificación**

La conservación de los recursos zoogenéticos, como el ganado bovino criollo de Ayacucho, viene disminuyendo con la propuesta de la política nacional que plantea el incremento de la productividad a partir de la importación de reproductores con una alta tasa productiva, pero con ninguna adaptación a las condiciones extremas de las zonas altoandinas; tal vez provocando proceso de erosión genética con pérdida de genes de resistencia y/o adaptación logrados por el bovino criollo.

La criopreservación es una técnica efectiva para conservar material genético, pero se desconoce qué método de criopreservación es el más adecuado para ovocitos bovinos criollos de Ayacucho.

Esta investigación busca contribuir a la conservación de esta valiosa genética y proporcionar información científica para el desarrollo de estrategias de conservación de recursos genéticos en la región andina; como estrategia clave para enfrentar desafíos futuros frente a la amenaza al efecto del cambio climático.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

En términos de la efectividad de transmitir tecnología de generación en generación, las biotecnologías reproductivas se encuentran entre los mejores métodos. La primera generación fue la inseminación artificial en 1908, luego como segunda generación aparece el control hormonal del estro y la ovulación, la transferencia de embriones y la congelación de gametos a partir de 1970. La tercera generación es el sexado de embriones y espermatozoides y la producción *in vitro* de embriones en 1987. La cuarta generación es la clonación de células somáticas en 1997 y por último aparece como quinta generación la transgénesis en el año 2000 (Ramón Ugalde & Cervera Paul, 2015).

Las distintas biotecnologías reproductivas han permitido una mayor contribución genética de la hembra, ya que el número crías por hembra, a lo largo de su vida reproductiva, incrementó significativamente con las técnicas de transferencia y producción *in vitro* de embriones (Dias Gonçalves et al., 2007). Según la Sociedad Embrión Internacional de Transferencia (IETS), Brasil es el mayor productor de embriones de la especie bovina a nivel mundial, cubriendo casi un tercio de la producción mundial. En el Perú la producción *in vitro* de embriones se viene desarrollando gracias a Láctea S.A y su Laboratorio de Embriones Sembryo, implementado en Virú, La Libertad, es así que para el 2016 Sembryo tiene 500 crías nacidas por transferencia de embriones y fertilización *in vitro*, ejemplares que son comercializados a diferentes regiones del Perú: Ayacucho, Piura, Lambayeque, Cajamarca, Cutervo, Leymebamba y Huánuco (Oriundo Núñez, 2018).

En la actualidad, se desarrollan diversos métodos de Criopreservación, entre los métodos existentes, tenemos los de congelamiento lento y vitrificación. Tenemos evaluaciones con distintos investigadores que a continuación se detallan:

Fuku et al. (1992) quienes, en su investigación desarrollada en el Universidad McGill y Centro Agrícola de Canadá, buscaron determinar la supervivencia morfológica de los ovocitos bovinos por el método de vitrificación y congelación lenta en la etapa de la vesícula germinal (VG), para esto se estudió la muestra probabilística de vitrificación 148 ovocitos y 132 ovocitos para congelación lenta, entre la categoría A y B de (COC). Aplicaron el uso de métodos de criopreservación y las soluciones de cultivo, considerando como indicador para la evaluación de su desarrollo. En ello encontraron que la vitrificación y congelación aplicada a ovocitos inmaduros dio como resultado una supervivencia y escisión muy pobres, ningunos llegaron al estadio de mórula y blastocistos. Se concluye que ninguno de los métodos de criopreservación ha llegado a la supervivencia de blastocistos.

Matsumoto et al. (2001) el presente estudio fueron desarrollados en la Universidad de Tehoku, Sendai - Japón, tuvo como objetivo mejorar la viabilidad y el desarrollo posterior de los ovocitos tras la criopreservación por vitrificación de grandes cantidades de ovocitos bovinos inmaduros utilizando malla de nailon como novedoso contenedor, para esto se estudió una muestra probabilística de 421 y 1033 ovocitos usando malla de nailon de (10-20), (40- 65) y 488 de ovocitos inmaduros para rejilla EM. Para maximizar el ritmo de maduración y desarrollo embrionario, así como la formación de blastocistos viables, se vitrificó una cantidad significativa de ovocitos bovinos inmaduros utilizando una malla de nailon de una manera que minimizara el daño estructural a los orgánulos. En esta investigación se encontró que podrían colocar hasta 65 complejos de ovocitos y células de cúmulos sobre una malla de nailon para vitrificación en comparación con 15 por rejilla EM. Las tasas de recuperación fueron mayores cuando se utilizó malla de nailon que EM rejillas, mientras que las tasas de fertilización y desarrollo no fueron diferentes. Estos resultados indicaron que la vitrificación usando la malla de nailon es útil y ofrece una nueva forma de criopreservar una gran cantidad de ovocitos. La investigación permite comparar los resultados con uso de malla de nailon y los resultados del estudio nuestro, con el uso de cryotop.

Otoi et al. (1995) investigaron en el Departamento de Ciencias Veterinarias, Universidad Yamaguchi, Japón, evaluando los efectos de la sacarosa con diferentes concentraciones (0, 1.0, 0.2M), en distintos grupos de

ovocitos frescos, inmaduros y maduros; para ello se estudió con las muestras probabilísticas de ovocitos inmaduros de 929, 876, 965, éstas se llevaron a congelación lenta en 1.8M EG con diferentes concentraciones de sacarosa (0, 1.0, 0.2M). Después de la descongelación y la dilución del crioprotector, se evaluó la supervivencia de los ovocitos morfológicamente y también mediante fertilización *in vitro* y cultivo. La sacarosa no tuvo efecto sobre las tasas de supervivencia y fertilización de los ovocitos congelados-descongelados. Sin embargo, se obtuvieron tasas de escisión más altas de ovocitos inmaduros congelados-descongelados con 0,2 M de sacarosa utilizada en combinación con EG. Además, ninguno de los ovocitos inmaduros congelados en EG sin sacarosa se convirtió en blastocistos, pero aproximadamente el 1% de los ovocitos inmaduros congelados con sacarosa se convirtieron en blastocistos. Las tasas de escisión de los ovocitos maduros congelados en EG fueron significativamente menores con sacarosa que sin sacarosa. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa en el desarrollo de blastocistos. La transferencia de cuatro blastocistos derivados de ovocitos inmaduros congelados y descongelados a dos novillas receptoras dio como resultado una preñez.

Prentice Biensch et al. (2012) realizaron la investigación en el Departamento de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Saskatchewan, Canadá, con el objetivo de evaluar los efectos de los crioprotectores, el procedimiento de vitrificación y el tiempo en la solución calentadora que contiene sacarosa sobre la escisión y el desarrollo embrionario de bovinos inmaduros. Se estudió con 420 (AOC), de los cuales se dividieron en cuatro grupos: **1.** grupo control sin tratamiento, **2** grupo VS1: los ovocitos se expusieron a una solución de vitrificación VS1 que contenía 7,5 % de etilenglicol (EG) + 7,5 % de dimetilsulfoxido (DMSO), +20% de suero de ternera en TCM. 199 a 37 C, durante 5 min.**3** Grupo VS1+VS2: se expuso a VS1 luego VS2 (15 % de etilenglicol (EG) + 15 % de dimetilsulfoxido (DMSO), +1,7% de sacarosa +20% suero de ternera en TCM. 199 a 37 C, durante 45 – 60 s. grupo **4:** los ovocitos se expusieron a VS1 y VS2, estas se cargaron en NL, luego se calentaron en TCM .199 +1,7% de sacarosa +20% suero de ternera en 37C, durante 1min. Teniendo en cuenta una muestra probabilista de 127 ovocitos en la etapa VG., del grupo 4., después se sometieron a MIV, FIV, CIV, encontraron que la tasa de escisión y blastocistos fueron menores en el grupo vitrificado que en el resto. Los crioprotectores

permanentes (EG y DMSO) presentes en las soluciones VS1 y VS2 y el tiempo en la solución de calentamiento que contiene sacarosa, No hubo impactos negativos sobre la escisión y las tasas de blastocistos inmaduros. Este estudio permite comparar los resultados según los objetivos del estudio.

Somfai & Hirao (2021) desarrollaron el estudio en el Instituto NARO de Ciencias de la ganadería y los pastizales, Tesukuba, Japón. El objetivo de este estudio fue crear un método para vitrificar ovocitos inmaduros utilizando proteína libre de una manera que diera como resultado los mejores embriones posibles para futuras tasas de fertilización y desarrollo *in vitro*. Para esto se estudió las muestras probabilísticas de los dos protocolos CPA diferente. El protocolo A00 usó 147 ovocitos y empleó una combinación de etilenglicol y propilenglicol como crioprotectores permanentes (pCPA) y equilibrio en 4% de PCPA total (2% etilenglicol +2% propilenglicol). El protocolo B00 usó 152 ovocitos y empleó una combinación de etilenglicol y DMSO y equilibrio en pCAP total al 15% (7,5% de etilenglicol + 7,5% de DMSO). Pero con el Protocolo A, significativamente se encontraron más células de blastocisto. Para crioconservar ovocitos de bovinos inmaduros, este estudio desarrolló un proceso de vitrificación que produjo una alta densidad de blastocitos utilizando medio libre de proteínas.

Schellander et al. (1994) efectuaron su investigación en la Universidad de Viena, Austria, quienes tuvieron como objetivo determinar los efectos de los diferentes crioprotectores y carbohidratos en la congelación de ovocitos bovinos maduros e inmaduros, para mejorar la supervivencia y el desarrollo de los ovocitos después de la descongelación, usaron diferentes concentraciones de crioprotector en ovocitos inmaduros, luego fueron expuestos a diversos carbohidratos; para ello se tomó en cuenta la muestra probabilística de 521 ovocitos inmaduros, con el uso de del crioprotector (PROH) propilenglicol en diferentes concentraciones (1M; 1,5M), después de la descongelación los ovocitos fueron expuestos al carbohidrato sacarosa a una concentración de 0,1 M y 0,25 M para la eliminación del crioprotector y estos fueron estudiados mediante maduración, fertilización y cultivo *in vitro*. En esta investigación encontraron que el glicerol y PROH, produjeron una escisión significativamente mayor y una tasa de cuatro indicadores en comparación con DMSO (<0,001). Entre los crioprotectores el DMSO fue menos adecuado, en ambas concentraciones, que PROH y glicerol para el desarrollo de embriones en

estadio de 8 a 8 células en grupo GV. Se concluye que el uso de carbohidratos durante la rehidratación no produjo ningún efecto beneficioso en el clivaje.

Sprícigo et al., (2014) quienes, elaboraron su investigación en la universidad de Brasilia, Brasil, evaluaron el resultado de la vitrificación en diferentes momentos de maduración *in vitro* (MIV), en cuanto a características morfológicas, funcionales y moleculares, en ovocitos bovinos con el método Cryotop. Para esto se estudió una población de 315 complejos cúmulus- ovocitos y éstas se distribuyeron en cuatro grupos y en diferentes momentos durante la MIV del ovocito: 0(0G0), 8(CG8), 22 (CG22) y 24 horas (CG24), luego fueron vitrificados, desvitrificados y devueltos a IVM hasta completar las 24 horas, se tomó en cuenta la vitrificación a las 22 horas, con una muestra probabilística de 81 ovocitos. Para su evaluación los COC fueron desnudos, fijados y teñidos con lacmoid. La capacidad del ovocito para alcanzar la MII, después de madurar, escindir y convertirse en blastocisto fue mayor en el grupo control ( $P < 0,05$ ), seguida de ovocitos vitrificados a las 22 horas. Se concluye que, a pesar de los bajos resultados la vitrificación puede utilizarse para la conservación de ovocitos bovinos. Esta investigación permitirá comparar los resultados obtenidos de acuerdo al objetivo general del estudio.

Sprícigo et al. (2012) el estudio lo realizaron en la universidad de Brasilia, Brasil, teniendo como objetivo diagnosticar el resultado de la metil-b-ciclodextrina (MbCD), como cargador de colesterol para cambiar la membrana plasmática del ovocito y aumentar su tolerancia a la criopreservación para esto obtuvo una muestra probabilística de 74, ovocitos utilizando el 2mg/ml MbCD como vehículo antes de la vitrificación, posteriormente fueron madurados, vitrificados y cultivados *in vitro*. Los experimentos Primero y Segundo se realizaron para investigar si MbCD podría mejorar la maduración nuclear y citoplasmática después de la exposición de los ovocitos al estrés por frío durante 10 o 30 minutos, respectivamente, no hubo diferencias ( $P > 0,05$ ) en cualquiera de los experimentos en la tasa de metafase II (MII) de ovocitos expuestos a Mb CD y estrés por frío. En el segundo experimento, un porcentaje menor de ovocitos presentaron cromatina degenerada ( $P < 0,05$ ) después de la exposición a 2mg/ml de MbCD en comparación con el grupo expuesto a 0mg/ml. En el tercer experimento, los ovocitos inmaduros fueron expuestos a MbCD y vitrificados después del calentamiento, observamos que la capacidad de alcanzar MII y la

degeneración de la (P<0,05) por MbCD. La tasa de blastocistos (P> 0,05) en D7 fue mayor en el grupo de 2mg/ml de MbCD. Concluyó que MbCD mejoró la maduración nuclear al reducir la degeneración de los ovocitos después del estrés por vitrificación. Debido a que pueden emplearse junto con otros compuestos que protegerían otras estructuras celulares del daño relacionado con el frío, este conocimiento es crucial para optimizar el uso de este enfoque para aumentar la supervivencia de ovocitos inmaduros después de la vitrificación.

Zhang et al. (2020) quienes realizaron la investigación en la Universidad de Ciencia y Tecnología de Henan, Lucyang, China, determinando el efecto de la temperatura de vitrificación y las concentraciones de crioprotectores en el transcriptoma de ARNm de ovocitos maduros bovinos después de la vitrificación en la etapa inmadura. los complejos de cúmulos de ovocitos (AOC) inmaduros se dividieron en cinco grupos: ovocitos frescos (control), ovocitos vitrificados en helio líquido (LHe; 269 C) con 5,6M CPAs (LHe 5,6M) ovocitos vitrificados en LHe con CPAs 6,6M (LHe 6,6M), ovocitos vitrificados en nitrógeno líquido (LN; 196 C) con 5,6M CPAs (LN 5,6M), y ovocitos vitrificados en LN con 6,6M CPAs (LN 6,6M), para esto se estudió una muestra probabilística de 287 ovocitos vitrificados en (LN 5,6M) y 289 en (LN 6,6M), luego fueron descongelados y sometidos a maduración *in vitro* (IVM), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV). Las tasas de morfología normal, maduración, división y las tasas fueron similares (P > 0,05) entre LHe 6,6 M y LN 6,6 M. La tasa de blastocisto del 13,31 % en LHe 5,6 M fue la más alta entre todos los grupos vitrificados (P < 0,05). En conclusión, los resultados de ovocitos vitrificados LN 6,6 M alcanzaron una mayor tasa de maduración, división y blastocistos frente a (LN 5,6M), esta investigación permite comparar los resultados obtenidos de acuerdo al objetivo del estudio.

Zhou et al. (2010) quienes, desarrollaron la investigación en la universidad de Ciencia y Tecnología de Shanghai, China, con el objetivo de evaluar el efecto de la presencia de células del cúmulo en el resultado de la vitrificación de ovocitos bovinos inmaduros (GV) o maduros (MII), y con el fin de determinar si el proceso de vitrificación cryotop mejora la viabilidad y el potencial de maduración de los ovocitos bovinos mediante la introducción de bloqueadores de hielo en el medio de vitrificación. Se tomó en cuenta la muestra probabilística es de 177 ovocitos GV encerrados en cúmulos y 143 ovocitos parcialmente

desnudos y estas se vitrificaron en 15%EG+ 15% Me2SO + sacarosa 0,5M. Los ovocitos agrupados vitrificados en la etapa GV tuvieron una supervivencia, escisión y tasa de blastocistos mucho mejores que los ovocitos parcialmente desnudos (93,8% frente a 81,3%, 65,8% frente a 47,3%, 11,3% frente a 4,0%, respectivamente,  $P < 0,05$ ). Sin embargo, no significativo se detectó un efecto de cobertura de cúmulos entre los dos grupos cuando se vitrificaron en MII (93,0% frente a 91,8%, 35,2% frente a 36,8%, 5,0% frente a 4,4% respectivamente. Los ovocitos encerrados en cúmulos vitrificados en el GV exhibieron una competencia de desarrollo significativamente mayor que aquellos vitrificados en la etapa MII ( $P < 0,05$ ). Esta investigación nos permite comparar los resultados obtenidos de acuerdo al objetivo del estudio.

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. *Bovino criollo en el país***

El bovino Criollo en el Perú desciende del ganado que Cristóbal Colón trajo a las Américas en su segundo viaje en 1493 (Primo, 1992); naturalmente, había diversos grados de pureza entre ellos, pero en la mayoría de los casos, se mantuvieron puros y adaptados a ciertos hábitats.

En el país, nuestro ganado bovino criollo en la sierra y altiplano representa una población mayoritaria y es la base que sustenta la alimentación y nutrición proteica de las familias de la región andina que desarrollan de forma empírica y sin ninguna planificación en el manejo (INEI & MINAGRI, 2013). Esta ganadería se desarrolla sobre los 3500 msnm en lugares fríos y con un manejo poco desarrollado y muy poco valorado pese a sus múltiples virtudes en términos de resiliencia y resistencia a las enfermedades, a la eficiencia en la digestión de los escasos nutrientes, a la producción y la salud que demuestra pese a las inclemencias del tiempo.

La política nacional con proyectos de desarrollo ganadero elabora enfoques en el incremento de la productividad a partir de la importación de reproductores con una alta tasa productiva, pero con poca o ninguna adaptación a las condiciones extremas de los andes; tal vez provocando procesos de erosión genética con probable pérdida de genes de resistencia y/o adaptación logrados por el bovino criollo.

Dado que en Latinoamérica y El Caribe se proyecta que el porcentaje de

ganado criollo descrito y caracterizado que se retenga en estado puro, sería mucho menor, rondando el 20% (FAO, citado por Cevallos et al., 2016). Esto representa un escenario muy preocupante, ya que se trata de un recurso que está en peligro debido a la falta de estrategias de preservación y que, cuando se expone a cruces aleatorios de razas, se pierde irremediablemente como material genético puro (INEI, 2014).

El esfuerzo por mantener el material genético puro, el vacuno criollo debería tener prioridad y hacia ello la conservación de esta como raza pura, es una necesidad urgente para evitar su extinción, basándose su estudio en la crioconservación del material genético con miras al futuro como estrategia clave para enfrentar desafíos futuros frente a la amenaza al efecto del cambio climático, como sequías, calor y otras adversidades.

### **2.2.2. Obtención de ovarios y ovocitos**

#### **a) Obtención de ovarios**

Los ovarios, provienen de vacas que se beneficiaron durante todo el proceso de parto, justo después de que el animal se benefició (Sirard et al., 1992), y hasta 30 minutos después de la beneficencia, ignorando el ciclo estral del ganado. El transporte se realiza en soluciones salinas que contienen antibióticos (cloruro de sodio). Si bien se recomienda que pasen un mínimo de 2 a 5 horas entre la recolección de ovocitos y el cultivo, la investigación de Yang *et al.* (1990) sugiere que la maduración de los ovocitos aún puede ocurrir hasta 8 horas después de la recolección, siempre que la temperatura permanezca por encima de 24 ° C. Para aumentar la probabilidad de obtener folículos maduros y de alta calidad, los ovarios deben provenir de animales jóvenes (Gordon & Lu, 1990).

#### **b) Selección de folículos**

La selección de folículos antrales de diámetro comprendidos entre 2 y 8 mm deben aspirarse Delgado Fernández (2017) porque los ovocitos en folículos menores de 2 mm tienen una mayor proporción de ovocitos incompetentes o atrésicos, mientras que los ovocitos en folículos mayores de 10 mm tienen una mayor proporción de ovocitos degradados (Lonergan et al., 1990). Los folículos de 2 a 6 mm de diámetro se recomiendan para cultivo porque aumentan la tasa

de recuperación de ovocitos, que se define como el número de ovocitos obtenidos dividido por el número de folículos aspirados (Delgado Fernández, 2017).

### **2.2.3. Obtención de los ovocitos**

#### **a) Ovocitos pre – ovulatorios**

Los dos tipos de ovocitos pre ovulatorios son de un lado los ovocitos foliculares que están completamente inmaduros, y de otro lado, los que casi han terminado de madurar.

El método más típico para obtener ovocitos inmaduros es la aspiración, lo cual implica extraerlos de los ovarios de hembras que han sido eliminadas, usando agujas estériles de 18 g acopladas a jeringas estériles de 5 ml, por el cual se aspiran folículos que varían en diámetro de 2 a 6 mm.

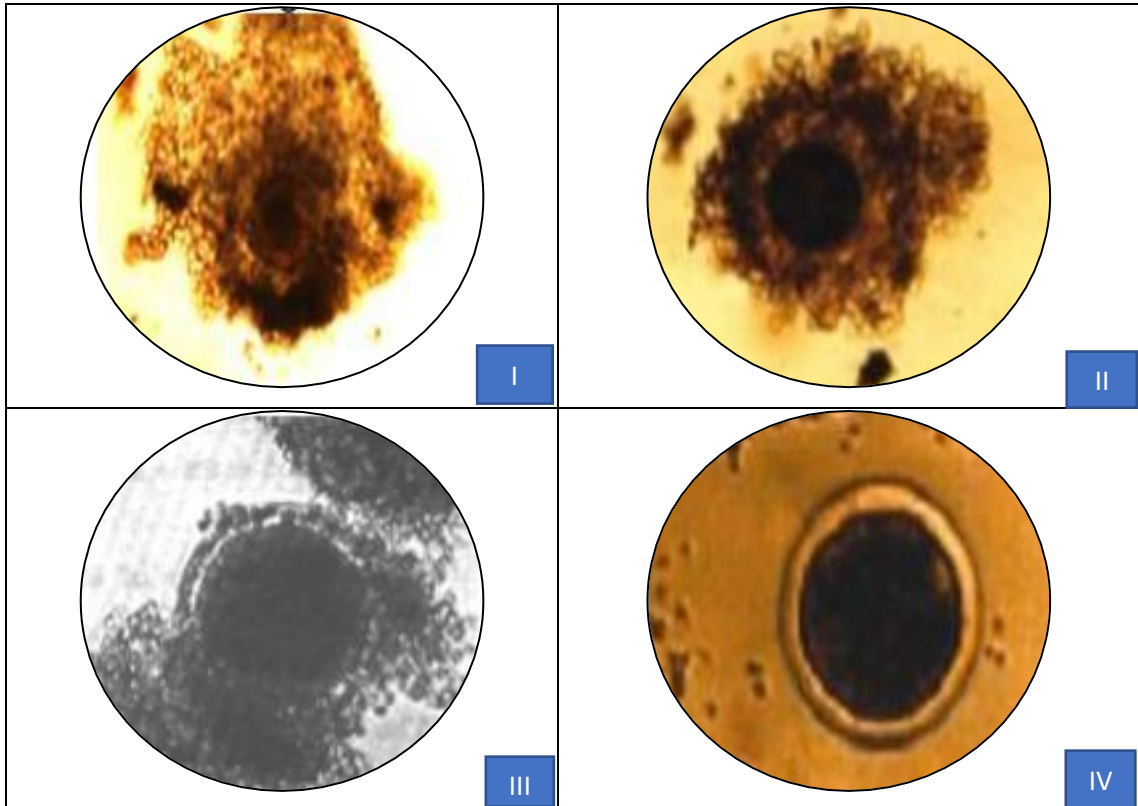
Otra técnica de obtención de ovocitos es la disección de ovarios, la cual consiste en seccionar la corteza del ovario mediante cortes horizontales y transversales y luego presionar introduciéndolo en un tubo cónico o placas de Petri con medio de lavado, y dejándolos sedimentar por unos minutos. Luego, para eliminar los componentes foliculares que impiden o prohíben el desarrollo (líquido folicular, células de descamación, sangre, adherencias, etc.), se lavan muchas veces (Fukui et al., 1990).

#### **b) Clasificación de ovocitos por calidad y madurez**

- **Categoría I:** Ovocitos que tienen un citoplasma homogéneo y uniformemente granuloso y más de tres capas de células agrupadas compactas.
- **Categoría II:** Ovocitos con menos de tres capas de células del cúmulo y citoplasma generalmente homogéneo.
- **Categoría III:** Ovocitos con una sola capa de células del cúmulo y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras.
- **Categoría IV:** Ovocitos denudados
- **Categoría V:** Ovocitos madurados *in vivo*, con cúmulo expandido.

### Figura 1

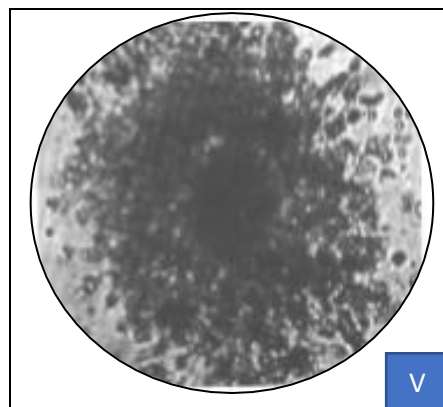
*I. Ovocitos rodeados de 6 capas de células de cúmulo, II. Ovocitos rodeados de 2 capas de células de cúmulo, III. Ovocitos con pocas células de cúmulo, IV. Ovocitos desnudos.*



Citado por (Peláez Peláez, 2011).

### Figura 2

*Ovocitos con cúmulos expandido después de 24 h. de la maduración*



Citado por (Peláez Peláez, 2011).

## **2.2.4. Componentes de los medios de cultivo**

### **a) Parámetros biofísicos**

#### **❖ Osmolaridad**

Teniendo en cuenta los valores observados en las secreciones uterinas se asume que lo óptimo es 280 + -20 m Osm/kg serían ideales, Sin embargo, hay datos que sugieren los valores de alrededor de 245 mOsm/kg que favorecen el crecimiento embrionario (Duque et al., 2003).

#### **❖ PH**

Los embriones de mamíferos cultivados *in vitro* desarrollan un PH neutro o ligeramente alcalino entre 7.2- 7.6 (Orzuna Olivan, 2015).

#### **❖ CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>**

Para la maduración y fertilización de los ovocitos, la fase gaseosa que se utiliza está compuesta por 5% de CO<sub>2</sub> en el aire y con un 5% de O<sub>2</sub>. 90% N<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> para el desarrollo embrionario. Estas son similares a las registradas en el oviductos de algunas hembras mamíferos (Orzuna Olivan, 2015).

#### **❖ Agua**

En gran medida el crecimiento embrionario depende de la pureza de este componente, que también es el que constituye la mayor parte de cualquier medio de cultivo. En estos últimos equipos, el grado de pureza del agua puede ser controlado mediante la determinación de su resistencia al paso de la corriente eléctrica (cuanto mayor sea esta, mayor será su pureza). La mayor Resistencia ofrecida es 18.3 megaohms- cm a 25°C (Fernández et al., 2007).

### **b) Compuestos orgánicos**

Existen dos componentes en la formulación final de los medios de cultivo utilizado en la producción invitado de embriones.

#### **❖ Fuente de energía**

Las fuentes de energía más utilizadas en los medios de cultivo de ovocitos son el lactato, el piruvato y la glucosa. Se ha demostrado que, durante los

primeros estadíos, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizan preferentemente piruvato, lactato y glutamina como Fuente de energía.

En cuanto a los lípidos, se sabe poco sobre su papel en la producción de energía durante el desarrollo embrionario temprano. Sin embargo, en los últimos años se ha debatido sobre cómo ciertos componentes lipídicos, como el ácido linoleico, podrían mejorar la viabilidad de los ovocitos criopreservados. Esto implicaría añadir ácido linoleico a los medios de cultivo, pero no como fuente de energía, sino como fluidificador de la membrana plasmática (Mucci et al., 2006).

#### ❖ Fuente de proteína

Los aminoácidos no esenciales favorecen el desarrollo en estadíos tempranos, mientras que los aminoácidos esenciales favorecen en embriones con más de ocho células. Este cambio en la utilización de aminoácidos pareciera deberse a requerimientos específicos de las células embrionarias en donde las células trofoblásticas que dan origen a la placenta fetal utilizarían aminoácidos no esenciales y glutamina, mientras que las de la masa celular interna que originan al feto tendrían preferencia por los esenciales (Mucci et al., 2006).

La albúmina es un componente crucial del suero sanguíneo; es una proteína plasmática de carácter ácido soluble en agua. Sus grupos reactivos le permiten unirse a una variedad de moléculas, incluidas hormonas y ácidos grasos, y luego transportar estos compuestos al órgano blanco previstos a través del torrente sanguíneo. Junto con la inmunoglobulina G, que son las proteínas más abundantes del flujo oviductal, que puede variar su pureza entre lotes.

Algunos de los efectos benéficos que justifican la utilización del suero y la albúmina son:

- Proteger a los ovocitos y embriones en cultivo de sustancias tóxicas como metales pesados
- Aportar factores de crecimiento y ciertas hormonas.
- Reducir la tensión superficial del medio, evitando que los ovocitos y embriones se adhieran al instrumental como las placas de cultivo, pipetas, tubos, etc.

Se ha demostrado que el suero tiene un efecto fundamental en el desarrollo embrionario, inhibiendo los primeros estadíos y estimulando el desarrollo de mórula y blastocistos. Además, hay evidencia de que su uso

acelera el desarrollo embrionario, asociado a un número mayor de células embrionarias y una mejora en la tasa de producción y eclosión. Sin embargo, otros estudios encontraron que tanto la tasa de producción como el número de células embrionarias no fueron afectados por la presencia o ausencia de suero. (Mucci et al., 2006).

### **2.2.5. Agentes crioprotectores**

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de muy baja toxicidad, utilizadas para proteger células y tejidos del daño que se ocasiona durante el proceso de congelación y descongelación. Disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (disminuyen la temperatura durante la transición del agua de líquido a sólido). Estos también actúan estableciendo puentes de hidrógeno con otras moléculas biológicas, lo que hace que no pierdan su estructura fisiológica original y por lo tanto su viabilidad (Bajo Arenas, 2009).

Bioquímicamente existen tres tipos de crioprotectores (CP): los alcoholes (etanol, metanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa y sacarosa) y el dimetil sulfóxido (Vales García, 1984).

Dependiendo de su capacidad para atravesar en la membrana celular, los crioprotectores pueden clasificarse como agentes penetrantes o no penetrantes (Celestinos & Gatica, 2002).

#### **a) Crioprotectores penetrantes**

Según Shaw et al. (1995), los crioprotectores penetrantes tienen un bajo peso molecular y son capaces de atravesar las membranas celulares de forma activa o pasiva. (Albarracín Monje, 2005, Nucci, 2012, y Díez Monforte et al., 2010) todos afirman que el glicerol, el DMSO, el etanol, el polietilenglicol, el 1-2 propanodiol y el etilenglicol (EG) se encuentran entre estas moléculas. Al infiltrarse en la célula, estas sustancias la secan y ayudan a proteger el citoplasma. De los crioprotectores descritos anteriormente, el etilenglicol es el que se emplea con mayor frecuencia en la vitrificación de embriones debido a su rápida difusión a través de la membrana plasmática y baja toxicidad (Kasai et al., 1992; Emiliani et al., 2000).

### **b) Crioprotectores no penetrantes**

Estos compuestos son efectivos a velocidades altas de congelación muy altos debido a su alto peso molecular. Son importantes porque ejercen su acción protectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen asociarlos a los agentes penetrantes. Los cuatro más populares son glucosa, sacarosa, dextrosa y dextrano. Estas sustancias son polímeros que forman puentes de hidrógeno con el agua, reduciendo su actividad a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (Kuleshova et al., 1999).

### **2.2.6. Crioprotectores y aditivos**

#### **a) Holding**

Este es el primer medio de cultivo embrionario cuya fórmula ha sido adaptada para su uso con ovocitos bovinos como medio de mantenimiento. Los embriones pueden prosperar en condiciones de temperatura ambiente con la ayuda de Holding Plus, que contiene todos los aminoácidos críticos, hormonas de crecimiento, enzimas, sustratos energéticos y antibióticos que necesitan. Holding Plus no es un medio apropiado para el cultivo de los embriones de vacuno durante periodos largos y en incubadora de CO<sub>2</sub> (Cruz Negrete, 2015).

#### **b) Etilenglicol**

Protege la estructura proteica y regula la deshidratación previniendo el daño celular durante la congelación y descongelación, y de esa forma reduce la formación de cristales (Cruz Negrete, 2015).

### **2.2.7. Técnicas de criopreservación de ovocitos**

#### **a) Congelación lenta**

La congelación lenta, también conocida como congelación convencional a baja velocidad, es un método de crioconservación en el que la temperatura de la muestra se reduce a un ritmo regulado. Esta técnica consiste en bajar lentamente la temperatura de las células en una solución que contiene bajas concentraciones de crioprotectores para deshidratarlas antes de almacenarlas en nitrógeno líquido. Aunque el tiempo requerido para la congelación lenta varía según la especie y el tipo de célula, generalmente su proceso es largo más de 110 min., utilizando diferentes rampas de enfriamiento. Este tipo de

criopreservación comienza con una tasa de enfriamiento de 2°C/min hasta los -7°C para ovocitos y embriones y de 0,1 °C /min para espermatozoides, temperatura a la que se realiza el *seeding*. El *seeding* consiste en la inducción de la formación del primer núcleo de hielo en la solución donde se encuentran las células. Ese proceso provoca el aumento de la concentración de solutos de la parte líquida lo que supone una deshidratación celular. La siguiente rampa abarca de 0,3°C a -30°C/min para embriones y de entre 10 a -60°C/min hasta llegar a -80° C para los espermatozoides. Una vez alcanzada las temperaturas anteriormente mencionadas, las muestras continúan con una rampa de enfriamiento de -50°C/min hasta los -196°C, temperatura a la que se almacena. El término vitrificación se aplica a procesos muy rápidos de inmersión directa en nitrógeno líquido. Aunque el tiempo del proceso depende de la especie y del tipo celular, éste no supera los 15 minutos de duración. Dependiendo del tipo de soporte puede ser abierto o cerrado y del volumen de la solución, la velocidad de enfriamiento oscilará entre 1,000 °C/min y 50.000°C/min. (Matilla Pinto, 2017).

Las células pueden reaccionar osmóticamente deshidratándose cuando el enfriamiento se realiza lo suficientemente lento en procesos de congelación lento. Esto sucede por la mayor presión osmótica extracelular que el agua en su salida de la célula tiende a equilibrar. Para asegurar una deshidratación suficiente, el ovocito se expone al crioprotector durante un período que varía de 10 a 30 minutos. Desde el punto en el que comienza la formación de hielo, que normalmente se encuentra entre -5 y -9 °C, el rango de congelación típico continúa con una disminución de temperatura de 0,3 a 0,5 °C/minuto hasta alcanzar de -33 a -40 °C, después de lo cual pasa directamente al nitrógeno líquido. Sin embargo, se debe tener en cuenta que a una temperatura entre -5 y -9 °C puede haber un sobre enfriamiento en la pajilla con lo que se formarán cristales de hielo en el interior de la célula, dañando de esta manera sus organelos. Con la finalidad de evitar la formación intracelular de cristales de hielo se realiza el *seeding*, el cual consiste en que, una vez estabilizada durante 5 min la pajilla a una temperatura de -5 y -9 °C, se toca su pared con un objeto enfriado a -196 °C y de este modo se cristaliza el líquido extracelular de manera controladas, descritos por Fabbri et al. (2001).

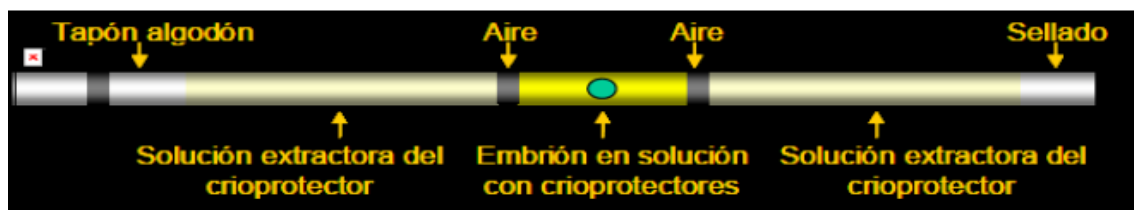
### b) Congelación lenta y descongelación de ovocitos

Voelkel & Hu, (1992) afirman que los ovocitos deben ser equilibrados en una solución de etilenglicol (5 - 10 minutos a temperatura ambiente), después deben cargarse individualmente en pajuelas de 0,25 ml aspirando una columna de medio Holding, luego una de aire, luego una de medio holding, luego una de aire , luego el embrión y luego se repite el proceso con medio Holding y aire 2 veces más luego se sella con alcohol polivinílico para introducir la pajilla en el CRYOCHAMBER, con el tapón de algodón hacia abajo, cronometrar dos minutos para proceder el SEEDING de la pajilla (pasar con la punta de una envuelta de algodón con nitrógeno líquido) y mantenerlos los ovocitos en la máquina de congelamiento lento a 22°C por minuto.

Para lograr la congelación, la temperatura se redujo gradualmente de 32 ° C a -6° C a una velocidad de -1°C/minuto. Después de inducir la nucleación, la temperatura se mantuvo a -6°C durante 10 minutos. Luego, la temperatura se enfrió a -30°C a una velocidad de -0,3°C/minuto y, finalmente, a -33°C a una velocidad de -0,1°C/minuto. Después de 2 minutos de detención a -33° C, las pajitas se colocaron en nitrógeno líquido (LN2) para mantenimiento (Barba Cáceres, 2016).

#### Figura 3

*Esquema de las partes de una pajilla*



Fuente: Barba. (2016)

Se necesitaron 10 segundos para retirar las pajuelas del tanque de nitrógeno y luego se calentaron a 37 ° C durante 1 minuto. Después de eso, se añadieron 100 µL de una solución de sacarosa 0,25 M a los ovocitos y embriones congelados, que luego se transfirieron a otra solución de la misma concentración y se dejaron reposar durante 5 minutos. Después de eso, se transfirieron a una tercera solución de sacarosa 0,12 M y se dejaron reposar durante 5 minutos. Luego se enjuagaron tres veces con una solución de PBS que contenía suero

fetal al 20% (Von Baer Hepp, 2004).

### **2.2.8. Vitrificación de ovocitos**

En la vitrificación, las soluciones acuosas pasan de un estado líquido a un estado vítreo sólido sin cristalización; en otras palabras, las moléculas de la muestra se inmovilizan cuando aumenta la viscosidad debido a la rápida caída de la temperatura.

Su estructura molecular es la de un líquido muy viscoso, pero debido a esto están en forma sólida. Se necesitan cantidades muy altas de crioprotectores o una velocidad de enfriamiento muy rápida (más de 2500°C/min) para lograr esta viscosidad extremadamente alta.

Como parte de la vitrificación, los ovocitos o el embrión se enfría a un estado de deshidratación y luego se descongela a un estado de hidratación. Esto sucede porque la concentración del soluto en las áreas no congeladas crece a medida que baja la temperatura, lo que se debe al aumento de la formación de cristales de hielo a partir del agua intracelular pura. Este choque osmótico es conocido como “efecto solución”, y puede llegar a ser dañino para la sobrevivencia de la célula o el embrión (Schneider & Mazur, 1984).

Debido a que estas variables están asociadas con la permeabilidad y toxicidad del crioprotector, es importante tenerlas en cuenta al realizar experimentos: volumen de muestra, concentración de crioprotector, método de adición, temperatura y tiempo de equilibrio, solidificación, velocidad de enfriamiento y cambios en el volumen (ARAV, 2000 y Miyake et al., 1993).

Durante el proceso de enfriamiento, la membrana líquida se encuentra en su fase de transición, que causa el mayor daño a los ovocitos y/o embriones entre -15 y -16 ° C. La fusión de liposomas afecta el comportamiento térmico de la membrana durante la transición de líquido a gel (Pugh et al., 2000; Zeron et al., 1999; Thompson et al., 1998) y la tasa de penetración de crioprotectores (Pugh et al., 2000; Thompson et al., 1998). La pérdida de microvellosidades, la ruptura de la zona pelúcida, el agrandamiento del retículo endoplásmico, las alteraciones mitocondriales, la alteración de la membrana plasmática y la alteración de las uniones celulares son ejemplos de lesión celular (Edashige et al., 1999; Ohboshi et al., 1997).

### 2.2.9. Vitrificación y desvitrificación

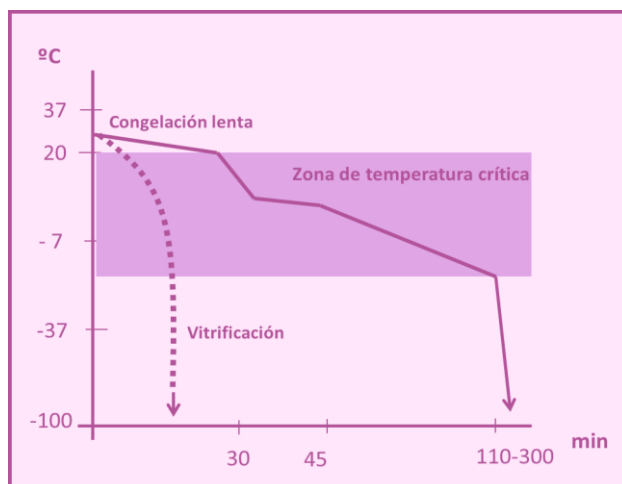
Sprícigo et al. (2012) proporcionaron una descripción actualizada del proceso de vitrificación. En este enfoque se usó una solución en equilibrio que contenía 7,5% de etilenglicol y 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) en una solución base (SB). Durante nueve minutos, el SB se mezcló con HEPES TCM-199 y SFB al 20%. Los ovocitos se colocaron en una solución de vitrificación que contenía etilenglicol al 15%, dimetilsulfóxido (DMSO) al 15%, glicerol y sacarosa 0,5 M en SB., donde se mantiene los ovocitos por 45 a 60 s. los se coloca en pajillas de 0.25 ml (1 célula por pajilla) y es sumergido de inmediato en el nitrógeno líquido

Los cryotops fueron retirados del tanque de nitrógeno líquido, para luego ser colocadas al medio de desvitrificación que consta de dos soluciones, la primera (1M+ 20% suero fetal bovino + 50 µg/ml Gentamicina) a 37° C por un minuto, la segunda (0.5 M + 20% suero fetal bovino + 50 µg/ml Gentamicina) a 37°C por 3 minutos (Sprícigo et al., 2014).

La actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, desarrollo, multiplicación, etc. todas se detienen esencialmente cuando los ovocitos y los embriones se exponen a temperaturas muy bajas (- 196°C en nitrógeno líquido). Esto permite la desvitrificación segura de ovocitos y embriones durante períodos prolongados de tiempo sin causar daño alguno a los ovocitos ni a los embriones.

#### Figura 4

Diagrama representativo de las rampas de enfriamiento



Fuente: Mantilla. (2017)

Los registros de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones revelan que más del 50% de 500 000 embriones de bovino transferidos en los últimos años han sido usados después de ser congelados y descongelados.

#### **2.2.10. Sistema de producción *in vitro* de embriones**

Los tres procesos principales en la creación *in vitro* de ovocitos y/o embriones bovinos son la maduración de ovocitos, la fertilización de ovocitos maduros y el cultivo de embriones. Estos pasos se siguen en secuencia cronológica independientemente del procedimiento utilizado. Cada una de estas tres fases depende de la anterior, y juntas conforman una complicada red de procesos fisiológicos sobre los que aún no hay mucha claridad.

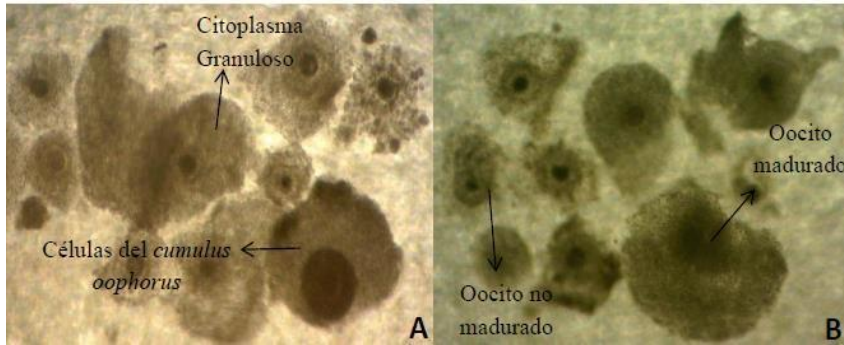
##### **a) Maduración de los ovocitos**

A medida que se desarrollan, los ovocitos experimentan un proceso de maduración nuclear y citoplasmática. La competencia meiótica, que es la capacidad de los ovocitos para reanudar la meiosis y convertirse nuclearmente maduros, es adquirida durante la foliculogénesis y coincide con la formación del antro, donde los ovocitos alcanzan aproximadamente el 80% de su tamaño final. La competencia ovocitaria, que está asociada con la maduración citoplasmática, es la capacidad de un ovocito para someterse a fertilización y generar un embrión que sea lo suficientemente viable como para sobrevivir a término y dar a luz a un ser vivo.

El ovocito se vuelve capaz de mitosis después de haber adquirido maduración citoplásmica. La competencia meiótica no es un requisito previo para la maduración citoplasmática en un ovocito. La maduración meiótica involucra una cascada de procesos, iniciada con una oleada de LH, promoviendo el progreso del ovocito a la metafase II y a la extrusión del primer cuerpo polar. Después de la oleada de LH, un evento que es importante para la reanudación de la meiosis, es la expansión de las células del cúmulo, la cual es causada por la producción de ácido hialurónico procedente de estas células en respuesta a las gonadotropinas (Downs et al., 1989).

## Figura 5

### Ovocitos obtenidos de MIV



A) partes de un ovocito madurado B) oocito madurado y no madurado

Fuente: (Crespo y Guamán 2015)

### b) Fecundación *in vitro*

Esta técnica está basada en la maduración artificial de oocitos que generalmente provienen de los ovarios de vacas sacrificadas en mataderos, los que posteriormente son fecundados con espermatozoides criopreservados (congelados descongelados), previamente capacitados; los cigotos resultantes se incuban en el laboratorio hasta la etapa de blastocisto. El FIV permite obtener embriones sincronizados a una etapa específica de desarrollo (Reyes, 2010). Los embriones de este método tienen el potencial de revolucionar las tácticas de reproducción al colaborar con otras biotecnologías como la clonación, el trasplante de células madre embrionarias o la transferencia nuclear para crear embriones transgénicos. (Reyes, 2010).

La muestra de semen es lavada y los espermatozoides móviles son separados de los inmóviles mediante swim-up (Parrish et al., 1986) o mediante gradientes de densidad (Van Soom et al., 1992), finalmente para lograr la fertilización, se incuban los oocitos con una cantidad determinada de espermatozoides en medio de fertilización (Fukui et al., 1990).

### c) Cultivo *in vitro*

Los embriones de 4 o más células resultantes de la fecundación *in vitro* son llevados del medio de fecundación a un medio de cultivo embrionario donde los embriones siguen su división celular a 8, 16 y 32 células hasta llegar al estadio de mórulas y blastocistos. Finalmente, al llegar a esta etapa los embriones pueden ser transferidos a vacas receptoras (en fresco) o congelados

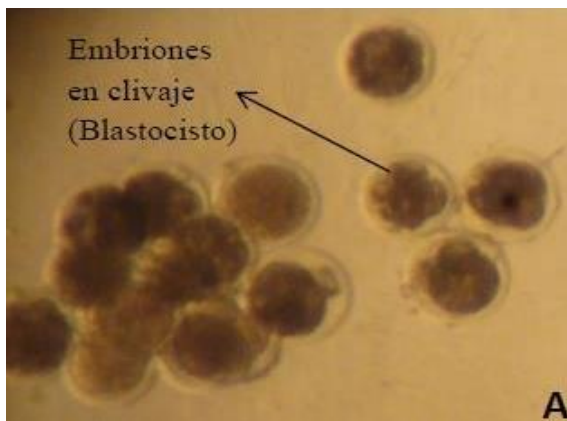
para su posterior uso. Durante esta etapa destacan la presencia en el medio de cultivo de diferentes fuentes de energía como la glucosa y aminoácidos esenciales y no esenciales (Gutiérrez et al., 2012).

Alrededor del 90% de los ovocitos inmaduros cultivados *in vitro* maduran hasta la metafase II y liberan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 horas posteriores a la maduración. Alrededor del 80% de estos encuentran un óvulo fertilizado y comienzan a dividirse, al menos hasta una etapa de 2 a 4 células. Sin embargo, después de cultivarse durante 6-7 días, solo el 25-40% llega a la etapa de blastocisto (B) o blastocisto expandido (Bex) (INTA, 2010).

El cultivo embrionario es la parte más lenta de la producción *in vitro*; también es el momento en que se decide la eficiencia general del sistema y la calidad de los embriones producidos (INTA, 2010). Sin embargo, también es el momento en que el sistema pierde la mayor cantidad de embriones. En consecuencia, la calidad de los embriones obtenidos se determina principalmente en esta etapa (Galli et al., 2003; Lonergan et al., 2003; Lonergan et al., 2004; Mucci et al., 2006).

## Figura 6

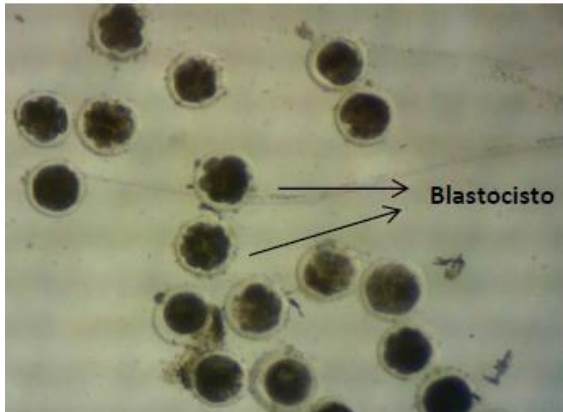
### *Embriones en clivaje*



Fuente (Crespo y Guamán 2015)

**Figura 7**

*Blastocisto al día 7*



Fuente (Crespo y Guamán 2015)

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Ubicación del trabajo**

##### **3.1.1. Trabajo de laboratorio**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción y Biotecnología de la E.P de MEDICINA VETERINARIA de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNSCH, Ubicado en Pampa del Arco del distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, Departamento de Ayacucho a una altitud de 2761 msnm y latitud 12° 7'7"s, con una temperatura media anual de 17.58°C, precipitación pluvial de 527.3 mm, humedad relativa promedio 40-50 %.

##### **3.1.2. Trabajo de campo**

A una altitud de 2750 msnm, en el distrito de Carmen Alto provincia Huamanga, zona, región Ayacucho, se recolectaron muestras del matadero del caserío campesino de "Quicapata" como parte del estudio de investigación.

##### **3.1.3. Tamaño de muestra**

Los ovocitos que conformaban la población provenían de 540 ovarios que pertenecían a 270 vacas criollas que fueron recolectadas en el matadero del caserío "Quicapata". A partir de los cuales, pudimos calcular la tasa de maduración ovocitaria, la tasa de escisión y la calidad de los blastocistos en cada grupo experimental con 9 repeticiones. La unidad de muestra consistió en 1319 ovocitos de las categorías A y B.

#### **3.2. Materiales de estudio**

##### **3.2.1. Material biológico**

Ovarios procedentes de vacas sacrificadas en el matadero de la Comunidad Campesina de Quicapata, ubicada en el distrito de Carmen Alto,

provincia de Huamanga.

### **3.2.2. Material físico**

- 01 termo con termómetro
- 01 caja de Guantes de látex.
- Estereoscopio NIKON
- Aguja N° 21 y jeringa de 10 ml.
- Tubo cónico de 50ml a 37°C
- Pipeta Pasteur
- Placas Petri de 100 mm cuadriculadas
- Bolsa de placas Petri 60mm
- Platina térmica
- Baño maría
- Papel toalla
- Incubadora de CO<sub>2</sub>
- Centrifuga
- Termómetro
- Sellador de bolsas
- Micropipetas de 0.5 – 10 µl
- Micropipetas de 100 – 1000 µl
- Micropipeta de 20 – 200 µl
- Puntas de 10 µl, 200 µl y 1000 µl
- Pajuelas plásticas 0.25ml
- Nitrógeno líquido
- Sellador de pajilla
- Pinzas hemostáticas
- Papel toalla
- Congelador criológico 5500
- Algodón
- Cronómetro
- Guardapolvo.

### **3.2.3. Insumos**

#### ✓ **Insumos para medios de manipulación**

(Suero fisiológico comercial +10% suero fetal bovino + gentamicina).

#### ✓ **Insumos para congelación lenta y descongelación**

##### **Congelación:**

(Holding +etilenglicol) (Voelkel & Hu, 1992)

##### **Descongelación:**

Baño de agua a 30°C (Serrano Novoa et al., 2002)

#### ✓ **Insumos para vitrificación y desvitrificación**

##### **Vitrificación:**

- Solución de equilibrio ((7.5% ethylene glycol + 7.5% dimethylsulfoxide (DMSO) + 20% suero fetal bovino + 50 ug/ml Gentamicina).
- Solución de vitrificación ((15% ethylene glycol + 15% DMSO + 0.5 M

sucrosa + 20% suero fetal bovino + 50 ug/ml Gentamicina) (Sprícigo et al., 2014).

### **Desvitrificación**

- Primera solución (1M+ 20% suero fetal bovino + 50 ug/ml Gentamicina)
- Segunda solución (0.5 M + 20% suero fetal bovino + 50 ug/ml Gentamicina). (Sprícigo et al., 2014).

#### ✓ **Insumos para MIV**

Medio comercial (Vitrogen®, Brasil)

#### ✓ **Insumos para FIV**

Medio comercial (Vitrogen®, Brasil)

#### ✓ **Insumos para CIV**

Medio comercial (Vitrogen®, Brasil)

### **3.3. Procedimiento metodológico**

#### **3.3.1. Obtención de ovarios y recuperación de ovocitos**

Se recolectaron del matadero de Quicapata ovarios de vacas criollas adultas y aparentemente sanas, la clasificación de estos animales se vio por la colorimetría y características fenotípicas de vacas criollas, los ovarios obtenidos fueron trasladados inmediatamente al laboratorio en solución salina al 0.9%, (9gr de NaCl en un litro de agua destilada más 1 ml de antibiótico o- gentamicina al 1%) temperados a 37°C, todo esto trasladado en termos.

Una vez en el laboratorio los ovarios se lavaron tres veces con solución salina fisiológica y fueron conservados en la misma solución a 37°C en vasos de precipitación atemperados en baño María. Los complejos cúmulos- ovocitos (COC's) fueron recuperados mediante el método de aspiración manual, tomándose en cuenta diámetro de folículos entre 2 a 6 mm (Verduzco et al., 2009 y Carolan et al., 1994) utilizando aguja hipodérmica 18mm y una jeringa de 10cc. El líquido folicular con los COC's recuperados se depositó en tubo falcón de 50 ml atemperados a 37°C donde se dejaron decantar por 15 minutos post aspiración. El sedimento se aspiró con una pipeta Pasteur y se depositó en placas Petri de 100 mm para ser diluido en medio de manipulación, conteniendo suero fisiológico comercial suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino) y antibióticos (gentamicina 1000 µl), con ayuda de un estereoscopio se realizó la

búsqueda de los ovocitos. Solamente los COC's con citoplasma homogéneo y más de dos capas compactas de células del cúmulus fueron utilizados, es decir de calidad A y B.

Los ovocitos con COC's seleccionados de calidad A y B fueron relativamente distribuidos en tres grupos experimentales:

- a) G1: Grupos control: ovocitos frescos
- b) G2: COC's congelados (D0).
- c) G3: COC's vitrificados (V0).

### Figura 8

#### *Manejo de ovarios y obtención de ovocitos*



A) Solución salina para el transporte de los ovarios B) colección de ovarios C) ovarios transportados a 37°C D) Aspiración folicular E) búsqueda de ovocitos F) Ovocitos seleccionados

### **3.3.2. Congelación lenta y descongelación de ovocitos**

Se ejecutó de acuerdo a ciertos criterios modificados por Voelkel & Hu (1992). Después de la selección los ovocitos fueron lavados en 10 gotas (1000 µl) de holding, manteniendo hasta encender el equipo de congelación. Los

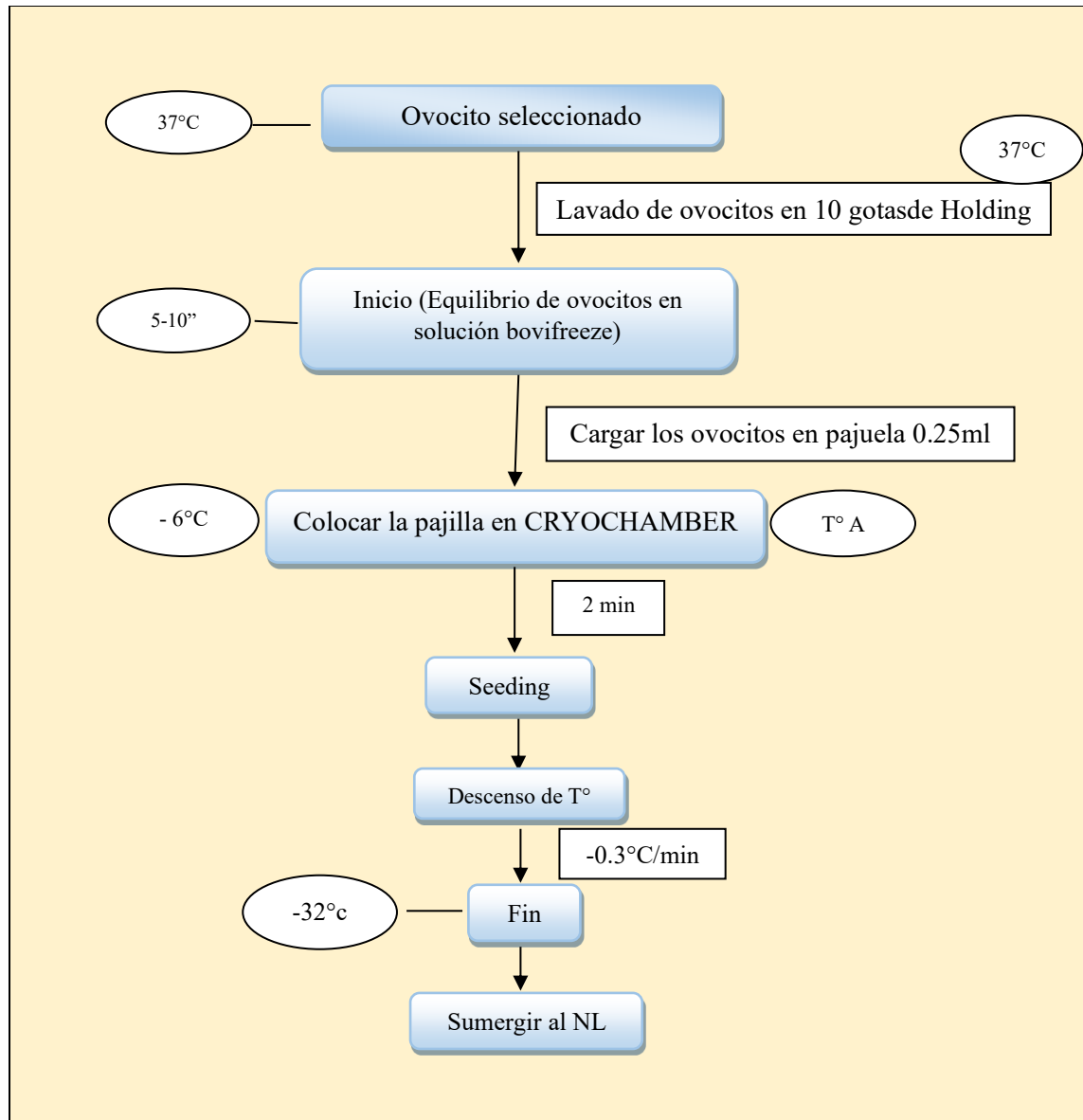
oocitos fueron equilibrados en una solución comercial Bovifreeze® (Etilenglicol + sucrosa) por 5-10 minutos a temperatura ambiente, luego se cargó en grupos de 10 en cada pajuelas de 0,25 ml aspirando una columna de holding, luego una de aire, luego una de holding, luego una de aire, luego el ovocito y luego se repite el proceso con aire y holding 2 veces más, después se selló con alcohol polivinílico para introducir la pajilla en el CRYOCHAMBER, con el tapón de algodón hacia abajo, cronometrando por dos minutos para proceder el SEEDING de la pajilla (pasar con la punta de una envuelta de algodón con nitrógeno líquido) (Fabbri et al., 2001).

Se usó crioconservación después de la selección de ovocitos. Para crioconservar ovocitos bovinos, el procedimiento se llevó a cabo utilizando la marca Freeze Control, de equipos de congelación, concretamente el modelo CL 5500 (Cryologic), con el número de programa 0. De acuerdo con el procedimiento de congelación habitual, los ovocitos de grado A se expusieron a etilenglicol (EG) 1,5 M en una sola etapa durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente (20-22°C) (Lonergan et al., 2004). Durante este tiempo, los ovocitos se envasaron en pajitas de 0,25 ml. Las pajitas se enfriaron a -6 ° C en un congelador durante 2 minutos para que estuvieran a una temperatura constante con el equipo. Después de 2 minutos, se tocaría la columna de retención o la columna de ovocitos con la punta de una pinza envuelta en algodón para iniciar el proceso de siembra. Después de que se completó el proceso de siembra, la temperatura se mantuvo estable durante 10 minutos (el período de estabilización). Después de eso, se redujo gradualmente de 0,5 ° C a -32 ° C hasta que se equilibraron la deshidratación y la formación de hielo intracelular. Después de eso, las pajitas se sacaron del aparato de congelación y se sumergieron en N<sub>2</sub>L (Greve & Madison, 1991).

El descongelamiento se hizo a las 24 horas a temperatura ambiente durante 10 segundos para luego sumergirlas las pajuelas en agua a 37°C por “30 s”, luego se colocaron en una placa Petri que contenga 2ml de medio de manipulación, (Guerra et al., 2012), luego se hizo el lavado en 100 µl de medio de maduración (Watanabe et al., 1998), para finalmente ser trasladados a la placa de MIV.

# Gráfico 1

## Proceso de congelación lenta de ovocitos



## Figura 9

### Proceso de congelación y descongelación



A) lavado de ovocitos en medio de holding B) encendido de equipo de congelación (CRYOCHAMBER) C) oocitos en medio de equilibrio (solución comercial Bovifreeze), D) Proceso de SEEDING de la pajilla E) Descongelación de la pajilla a 37°C F) lavado de ovocitos descongelados en medio de maduración

### 3.3.3. Vitrificación y desvitrificación de ovocitos

En el método de vitrificación se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Sprícigo et al. (2014) con modificaciones. Se utilizaron dos soluciones; una solución de equilibrio (7.5% ethylene glycol + 7.5% dimethylsulfoxide (DMSO) + 20% suero fetal bovino + 50 ug/ml Gentamicina por 9 minutos. Una solución de vitrificación (15% ethylene glycol + 15% DMSO + 0.5 M sucrosa + 20% suero fetal bovino + 50 ug/ml Gentamicina) donde se mantuvo al ovocito por 1 minuto. Los ovocitos se colocaron en cryotops y se sumergieron de inmediato en el nitrógeno líquido (Sprícigo et al., 2014).

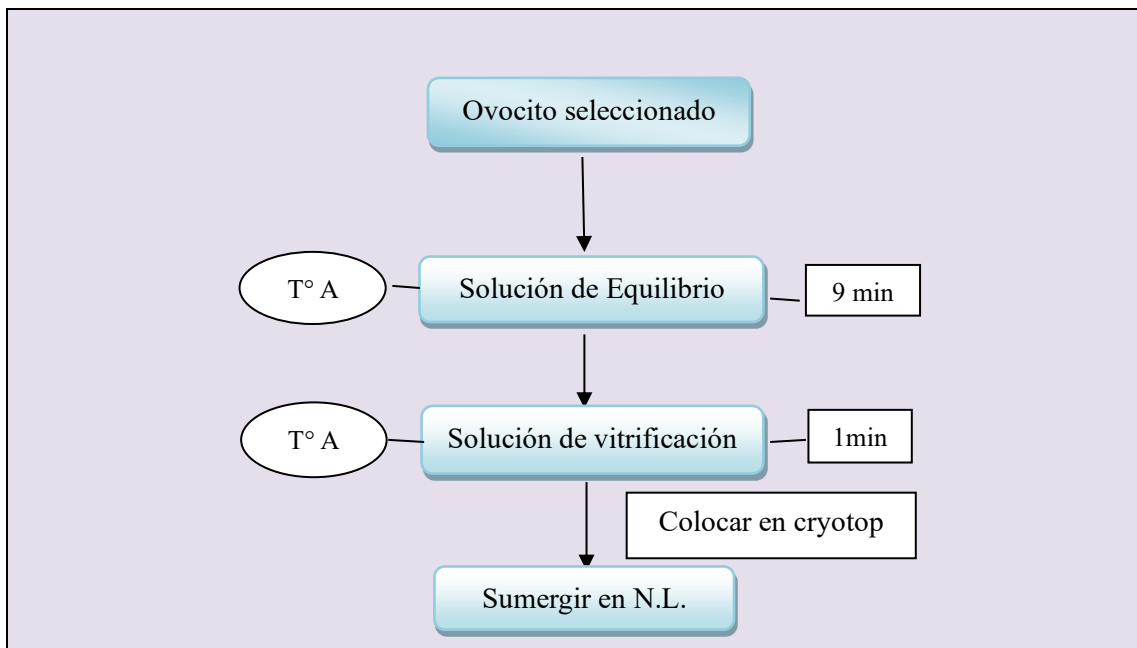
Después de retirar el cryotop del tanque de nitrógeno líquido, los ovocitos se transfirieron cuidadosamente sumergiendo la punta del cryotop en gotas de

una solución de desvitrificación que combinaba dos productos químicos diferentes:

- Primera solución (1M+ 20% suero fetal bovino + 50 ug/ml Gentamicina) a 37° C por un minuto.(Sprícigo et al., 2014).
- Segunda solución (0.5 M + 20% suero fetal bovino + 50 ug/ml Gentamicina) a 37°C por 3 minutos. (Sprícigo et al., 2014), respectivamente y posteriormente se enjuagaron en 100 µl de medio de maduración (Watanabe et al., 1998), luego fueron trasladados a las placas de MIV para su cultivo por 24 horas.

## Gráfico 2

*Proceso de vitrificación de ovocitos*



## Figura 10

Vitrificación y desvitrificación de ovocitos



*Leyenda: A) Ovocitos en solución de equilibrio y solución de vitificación, B) Cryotops comercial y elaborados en laboratorio, C) Colocación de cryotops en Nitrógeno líquido, D) Extracción de cryotops del tanque de nitrógeno, E) Desvitrificación en soluciones, F) enjuague de ovocitos en medio de maduración*

### 3.3.4. Maduración in vitro (MIV) de ovocitos

Para la MIV 24 horas antes se prepararon las placas de cultivo a condiciones de la incubadora (38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad saturada), donde se formaron 6 gotas de cultivo conteniendo 100 µl de medio por cada gota el cual fue distribuido en dos etapas: 50 µl de medio MIV (Vitrogen®, Brasil), 600 µl de aceite mineral para luego completar los 50 µl de medio y 600 µl de aceite mineral; a su vez se dejó atemperar en viales medio de MIV para el respectivo lavado de los grupos.

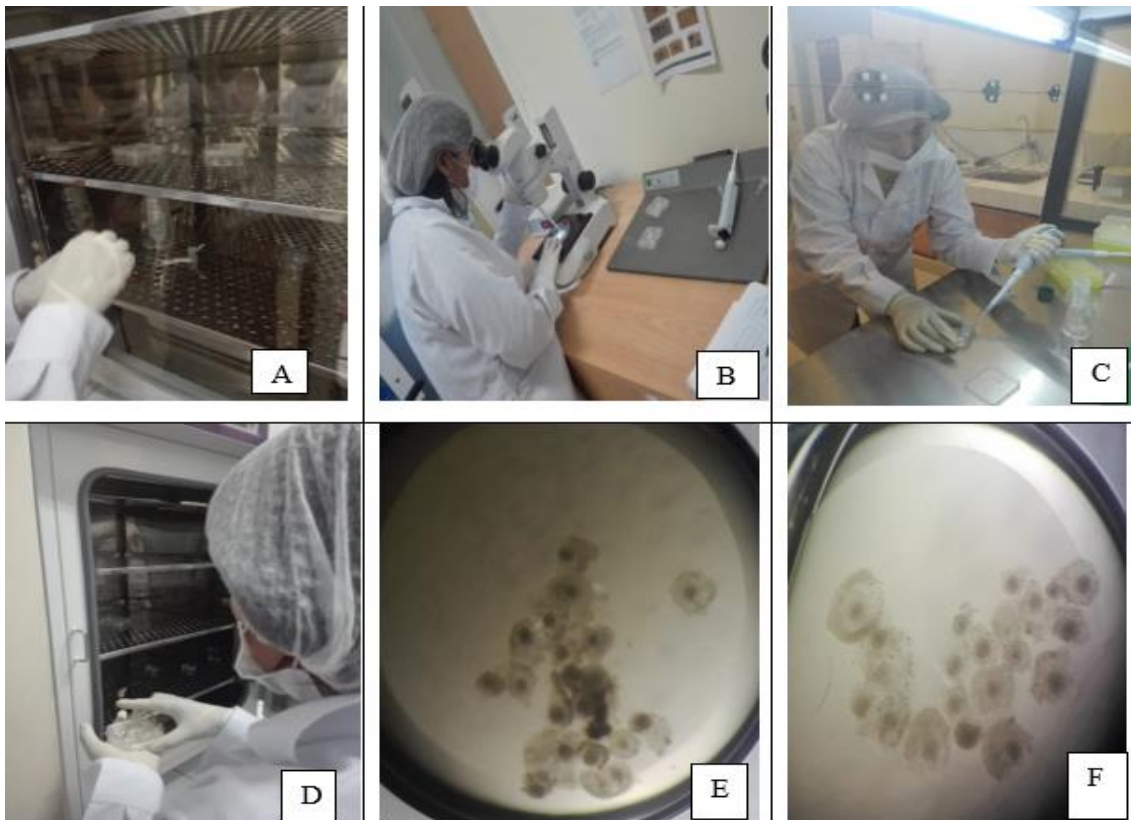
Una vez obtenidos los ovocitos en los diferentes grupos estos fueron lavados en medios de MIV, para luego ser trasladados a las gotas de cultivo a razón de 20 a 25 ovocitos por gota y cultivadas por 24 horas.

### 3.3.5. Evaluación de la madurez ovocitaria post cultivo in vitro

Usando un estereoscopio, observamos los ovocitos después de que hubieran madurado in vitro durante 24 horas; buscamos signos de presencia de corpúsculos polares y agrandamiento de las células del cúmulo. Se considerarán ovocitos maduros si tienen células del cúmulo expandido (Crespo Calva & Guamán Gutiérrez, 2015).

**Figura 11**

Proceso de maduración in vitro de ovocitos



*Leyenda: A) Preparación de las placas de cultivo, B) Selección de ovocitos para MIV, C) Lavado de ovocitos para MIV D) Colocación de placas de cultivo a la incubadora con ovocitos seleccionados para MIV, E) ovocitos inmaduros y F) Ovocitos madurados (células de cúmulo expandido)*

### 3.3.6. Capacitación espermática y fertilización in vitro (FIV)

Este método se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Watanabe et al. (1998) (Vitrogen-ivf.com). 24 horas antes se preparó en tubos Eppendorf a razón de 400  $\mu$ l de percoll diluido (90%) y percoll convencional (45%) todo ello en incubadora. Las pajillas de semen bovino (0.5ml) fueron retiradas del tanque con nitrógeno líquido y descongeladas en un termo a 36°C por 20 segundos y se llevó para la evaluación de la motilidad bajo el microscopio, Inmediatamente

el semen descongelado fue depositado en un tubo Eppendorf de 1.5ml sobre un volumen preparado para luego ser centrifugado a 3660 rpm/6 minutos; una vez obtenido el pellet (espermatozoides vivos) son transferidos a otros tubo Eppendorf conteniendo 400  $\mu$ l de medio FIV (se homogenice) para su segunda centrifugación a 3660 rpm/3 minutos.

Para la FIV: los ovocitos madurados son lavados en gotas de medio de FIV previa incubación de estos según tratamiento, donde se eliminó el exceso de células de cúmulos a fin de *asegurar la FIV*; al término del lavado de los ovocitos estos se trasladaron a una nueva placa con medio FIV previa incubación donde contenía 100  $\mu$ l de medio FIV con 1200 $\mu$ l de aceite mineral para luego ser llevados a incubación durante 18 horas.

### Figura 12

#### *Fertilización in vitro*



Leyenda: A) preparación de medio percoll diluido y percoll convencional, B) Selección de pajilla de semen bovino, C) Descongelación de la pajilla del semen bovino, D) Colocación del semen descongelado en portaobjeto, E) Evaluación del semen bovino, F) Centrifugación a 3660 rpm, G) Fertilización de ovocitos maduros, H) Placas de cultivo conteniendo ovocitos cubiertos con aceite mineral, I) los ovocitos y espermatozoides fueron mantenidos a condiciones de incubadora por 18 horas en FIV.

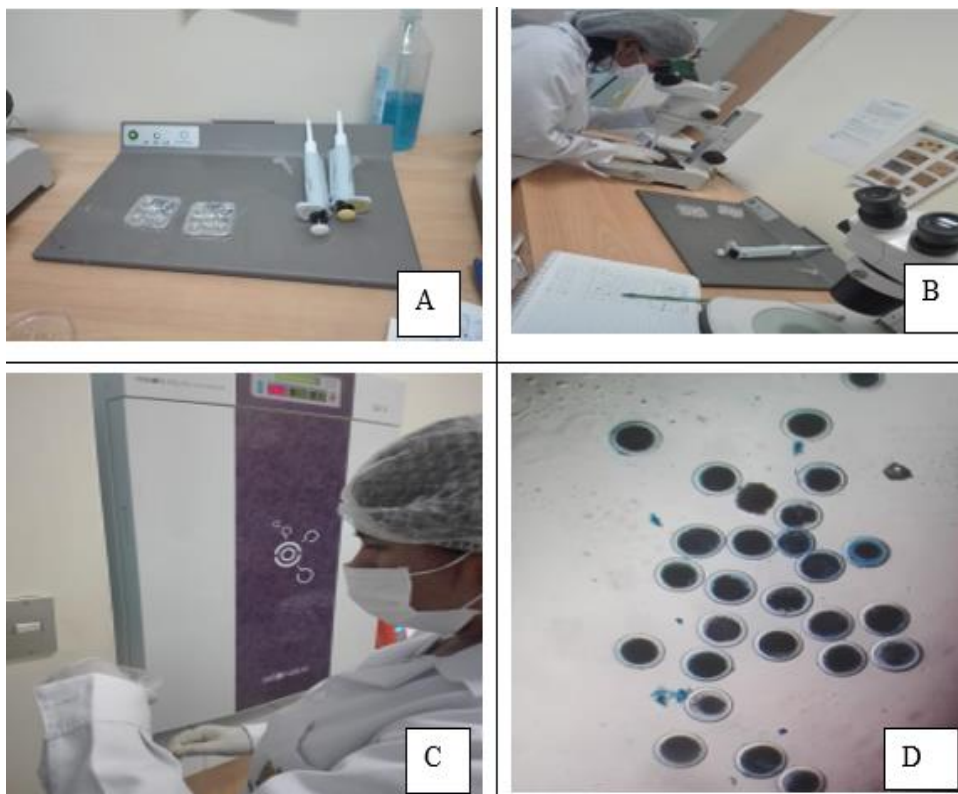
### 3.3.7. Cultivo embrionario in vitro

Transcurridas las 18 horas de FIV, los presuntos cigotos fueron desnudados por pipeteo a fin de remover las células de cúmulos, luego fueron lavadas en medio CIV y trasladadas a placas de cultivo 24 horas antes preparada e incubada conteniendo 100  $\mu$ l de medio CIV con 1200  $\mu$ l de aceite mineral; El cultivo se mantuvo a 38°.5 C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub> y aire saturado por 7 días: pero al cabo de 24 horas post cultivo se procedió a evaluar a los presuntos cigotos a fin de observar bajo estereoscopio la división o presencia de blastómeros, También se realizó el cambio de medio de cultivo y aceite mineral a razón de ser retirado 50  $\mu$ l de medio CIV para adicionar 50  $\mu$ l de medio CIV, lo mismo con el aceite mineral se retiró 600  $\mu$ l y se adicionó 600  $\mu$ l lo mismo para cada tratamiento; este procedimiento se realizó Inter diario a su vez se evaluó la división de las blastómeros según el día que corresponda.

El estadio de desarrollo y morfología de embriones fueron evaluados en cada cambio de medio de cultivo día 3 (5-8 células), 5 (mórulas), 6, 7, y 8 (blastocitos) y tasa de eclosión.

#### Figura 13

##### *Cultivo de embriones*



Leyenda: A) placas de cultivo con cigotos, B) Remoción de las células de cúmulus, C) cultivo in vitro de embriones en incubadora D) blastocistos (día 7)

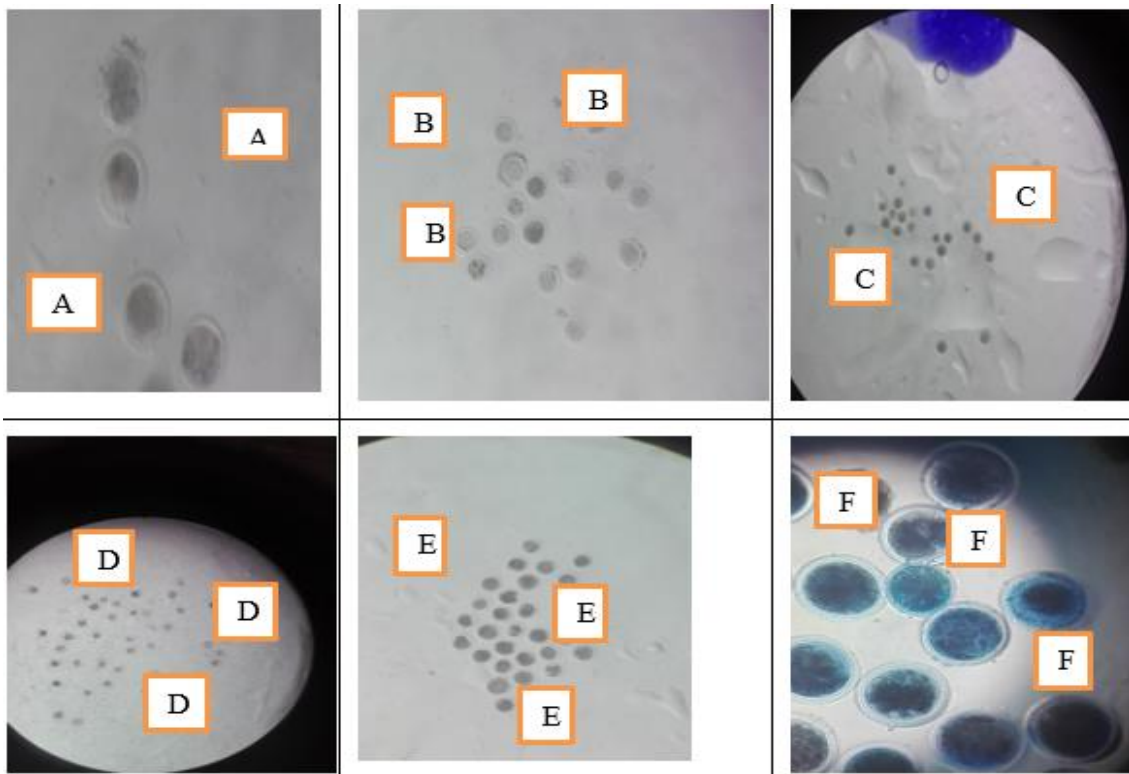
### 3.3.8. Evaluación de los estadios de desarrollo y calidad embrionaria

Las calidades morfológicas de los presuntos cigotos cultivados *in vitro*, fueron clasificadas según las normas de la INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (1990)- IETS a partir del día 3 de cultivo, donde fueron observados el porcentaje de clivaje (división celular), porcentaje de degenerados/muertos, porcentaje de mórulas y blastocitos, como también la calidad de estas últimas.

Las tasas de clivaje fueron cuantificadas de acuerdo al número de células divididas en el día 3 y 5 de cultivo (2, 4, 8 y 16 células).

**Figura 14**

*Evaluación del desarrollo embrionario*



*Leyenda: A) división en 2 células, B) división en 4 y 8 células, C) mórula, D) blastocisto temprano, E) blastocisto F) blastocisto a 100x*

Se consideró como degenerados/muertos a los ovocitos no fertilizados (UFO), con citoplasma granular y formas irregulares (ver figura 17) y ooplasma disperso dentro del espacio vitelino.

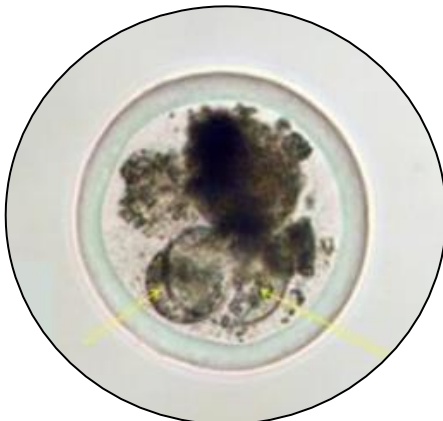
**Figura 15**

*Ovocito degenerado a 100x*



**Figura 16**

*Embrión degenerado, presencia de vacuola*



Los embriones considerados vivos y normales son clasificados en estadios de desarrollos de mórula, blastocisto temprano, blastocisto, blastocisto expandido y blastocisto tardío de acuerdo a la proporción de la masa celular interna.

La Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS), anteriormente conocida como Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Stringfellow & Seidel, 2000), utilizó los siguientes criterios para clasificar los embriones con el propósito de evaluar la calidad:

- **Calidad 1:** Mórula/blastocisto compacto (la masa celular debe ser mayor del 85 %), esférico, color claro, desarrollo de acuerdo a su edad, pocas vesículas, sin desechos celulares ni blastómeros extruidos.
- **Calidad 2:** Mórula/ blastocisto compacto (la masa celular debe ser mayor del 50 %) puede presentar una pequeña des compactación, color uniforme, desarrollo de acuerdo con su edad, presencia de pocas

vesículas, blastómeros extruidos y desechos celulares.

- **Calidad 3.** Mórula/blastocisto con una des compactación muy marcada (por lo menos el 25% de las células deben estar intactas), desechos celulares, color oscuro o zonas claras y oscuras, vesículas y blastómeros extruidos y masa pequeña.
- **Calidad 4.** Mórula/blastocisto con una degeneración muy marcada, masa pequeña (menor al 25 % de lo normal) color oscuro, des compactación muy marcada, vesículas e irregularidades en los blastómeros.

**2.3.9. Blastocistos viables**, viene hacer un embrión que ha alcanzado el desarrollo, generalmente 5 y 6 días después de la fecundación, que tiene la capacidad de implantación y desarrollo posterior.

**2.3.10 Calidad de Blastocistos**, se refiere a su morfología, estructura y potencial de implantación.

### 3.4. Análisis estadístico

Se usó un diseño completamente aleatorizado con tres tratamientos (un control) y nueve repeticiones por grupo experimental para normalizar los datos sobre la tasa de maduración de los ovocitos, la tasa de escisión y la calidad de las células blásticas. Luego analizamos los datos de manera combinada, al igual que un diseño equilibrado de parcelas divididas, con el factor experimental base aplicado a la parcela más grande y el factor de tratamiento de interés (métodos de criopreservación) aplicado a las subparcelas. R, un programa estadístico, se utilizó para realizar el estudio. Consideramos significativas las comparaciones de las medidas si el valor p era inferior a 0,05.

El diseño completamente aleatorizado (DCA) balanceado con efectos fijos utilizado en el presente trabajo es expresado de la siguiente manera:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}, \quad i = 1, 2, \dots, a; \quad j = 1, 2, \dots, n$$

donde:

$Y_{ij}$ : Valor observado en el  $j$ -ésimo ovocito sometido al  $i$ -ésimo tratamiento (tipo de Criopreservación).

$\mu$ : Media global.

$\tau_i$ : Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\epsilon_{ij}$ : Error aleatorio que incorpora todas las demás fuentes de variabilidad del experimento.

La eficacia es la capacidad de lograr el efecto de la congelación lenta y vitrificación de ovocitos bovinos criollos, que se espera al obtener blastocistos viables dentro del proceso de investigación, tomando la siguiente fórmula.

$$\text{Eficacia} = (\text{Resultado alcanzado} * 100) / (\text{Resultado previsto})$$

Donde:

Resultado alcanzado, son los datos obtenidos a partir de la tasa de blastocistos viables en la investigación nuestra.

Resultado previsto, son promedios obtenidos de los datos de la tasa de blastocistos viables.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Maduración ovocitaria *in vitro* (MIV)

**Tabla 1**

*Tasa de maduración de ovocitos bovinos criollos criopreservados en congelación lenta y vitrificación. Ayacucho*

<b>Grupo</b>	<b>Cantidad de ovocitos inmaduros</b>	<b>Tasa de madurados (%)</b>	<b>Tasa de no madurados (%)</b>	<b>Total (%)</b>
<b>Frescos</b>	430	98.2 % <sup>a</sup>	1.80%	100
<b>Congelación lenta</b>	438	78.6% <sup>b</sup>	21.40%	100
<b>Vitrificación</b>	451	77.0% <sup>b</sup>	23.00%	100

a, b significan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), mediante la prueba LSD

En la Tabla 1 se presentan resultados sobre la maduración ovocitaria *in vitro* como una de las primeras variables evaluadas en el presente estudio. Como puede apreciarse se trabajó con cantidades estadísticamente similares de ovocitos frescos, congelados y vitrificados, luego de 24 horas de iniciada la evaluación se obtuvo 98.2% de ovocitos maduros, cantidad estadísticamente superior en la obtención de ovocitos maduros en condiciones congelados y vitrificados; es decir el trabajo con ovocitos frescos ha sido mejor que aquellos trabajados con los dos métodos de criopreservación aquí desarrollados, debido a que ellos no han sido sometidos a ningún agente crioprotector ni a variaciones físicas, como sí lo son cuando se trabaja con los métodos de criopreservación.

Cuando comparamos entre las dos técnicas de criopreservación, estas son estadísticamente similares entre sí. Es decir, con la técnica de congelación lenta y vitrificación se logra la maduración de menor porcentaje situación que podría ser determinada por el daño que ocasiona el congelamiento y vitrificado en la primera división mitótica. Además, los efectos dañinos de la congelación y descongelación fueron evidentes hasta el clivaje de 2 células, pero, una vez superado este obstáculo, no afectaron el desarrollo posterior de blastocistos.

Este resultado es similar a lo mencionados por Fuku, Kojima, Shioya, et al.

(1992). Estas dos técnicas es decir la congelación lenta y vitrificación afectan la densidad de los folículos; a diferencia en los ovocitos frescos se mantiene la densidad y la calidad histológica, resultado similar a los determinados por Labrune et al. (2020) y Shi et al. (2017).

Actualmente la técnica de la vitrificación se viene utilizando preferentemente para la crioconservación de ovocitos humanos debido a la obtención de mayores tasas de éxito mientras que la congelación lenta sigue empleándose en trabajos con embriones bovinos (Do & Taylor-Robinson, 2020).

#### **4.1.1. Maduración por congelación lenta**

En el grupo tratado por congelación lenta, el porcentaje de COCs inmaduros obtenidos (Tabla 1) fue superior a los reportados por Fuku, Kojima, Shioya, et al. (1992) quienes, encontraron una tasa de maduración del 35% utilizando COCs inmaduros de calidad A y B, los cuales fueron sumergidos directamente en una solución de 1,2-propanodiol a 2.0 M en un suplemento TCM-199, mezclado con un 0.4% de albúmina sérica bovina, y equilibrados durante un periodo de 10 a 20 minutos, incluyendo el tiempo necesario para la carga en pajillas de 0.25 ml. Esta discrepancia en los resultados puede atribuirse al hecho de que los mismos autores señalan que los ovocitos bovinos inmaduros son más susceptibles al crioprocésamiento en la etapa de oocito germinal (GV). Agregan que el daño se hace evidente en el momento de la primera división mitótica. Según Sathananthan et al. (1987), la reorganización de los microtúbulos del huso es particularmente vulnerable a la exposición a temperaturas bajas, lo que lleva a que los ovocitos maduren tras la criopreservación en la etapa de vesícula germinal, y que la tasa de clivaje post-fecundación *in vitro* (FIV) sea aún menor. Además, el uso de procedimiento por congelación lenta para ovocitos bovinos resulta en tasas de supervivencia y maduración muy bajas.

Así mismo parte de los resultados son superiores a los reportados por Schellander et al. (1994) quienes, obtuvieron un 38% de maduración usando crioprotector (PROH) propilenglicol en diferentes concentraciones (1M; 1,5M), después de la descongelación observaron que los ovocitos quedaban expuestos al carbohidrato sacarosa una concentración de 0,1 M y 0,25, luego estas fueron llevados al proceso de MIV, FIV y CIV, la investigación indica que el glicerol y

PROH, produjeron una escisión significativamente mayor que el DMSO, el uso de carbohidratos durante la rehidratación no produjo ningún efecto beneficioso en el clivaje. A ello puede agregarse la experiencia de Lim et al. (1992) quienes observaron que la congelación de ovocitos en VG eran inferiores a los ovocitos maduros situación atribuible a la sensibilidad de la disposición de los microorganismos que genera un shock por congelamiento, y por la alteración de la actividad de síntesis de proteína.

Asimismo, estos resultados superan los obtenidos por Otoi et al. (1995) quienes, reportaron una tasa de maduración del 9.2% en ovocitos inmaduros que fueron congelados y descongelados utilizando sacarosa a 0.2 M en combinación con etilenglicol (EG); agregando que en el estudio que realizaron incluyeron una preequilibración con sacarosa para mejorar la tasa de supervivencia de los ovocitos bovinos.

Dado que los ovocitos conservados con células de cúmulos mostraron mejores resultados en términos de tasa de maduración, sugiere que las células de cúmulos proporcionan cierta protección contra daños crioinducidos al mantener las configuraciones normales de cromatina (Fuku, Kojima, Shioya, et al., 1992).

Hasta la presentación del presente trabajo no se encontraron otras investigaciones que hayan desarrollado la congelación lenta de ovocitos bovinos, más aún en el ganado vacuno del tipo criollo situación que podría estar influenciada por resultados de poca trascendencia, debido a que la congelación lenta puede provocar lesiones celulares significativas.

#### **4.1.2. Maduración por vitrificación**

El porcentaje de COCs maduros obtenidos en el grupo de vitrificados fue de 77.0% ( tabla 1) inferior a los resultados reportados por Matsumoto et al. (2001) quienes, informaron que el uso de las técnicas de la rejilla EM, la malla de nailon (10-20), o malla de nailon (40-65) como nuevos recipientes, para el proceso de vitrificación, haber determinado resultados muy variados mediante la introducción de estas tres técnicas (84, 94 y 97%) respectivamente, resultado que podría estar influenciado por el enfriamiento y calentamiento, situación que permite el contacto directo entre los ovocitos que contienen medio y nitrógeno líquido por lo tanto incrementa el éxito de los procedimientos de vitrificación y por

el mismo hecho de que estos contenedores son adecuados para la vitrificación de un gran número de ovocitos y se sugiere el uso de malla de nailon como nuevo recipiente, para minimizar el daño estructural en los organelos y optimizar la tasa de maduración y desarrollo embrionario. El resultado del presente estudio resulta inferior debido probablemente a la utilización de pajita estándar por la técnica de cryotop, estas pajitas limitan la velocidad máxima de enfriamiento y calentamiento a menos de 200°C/min.

Así mismo, la maduración de ovocitos por vitrificación resulta menores a los reportes de Zhou et al. (2010) quienes, determinaron un 93.8% para la tasa de maduración usando la solución de equilibrio HM que contenía 7,5 % de etilenglicol (EG) y 7,5% de dimetilsulfoxido (MeDSO) durante 15 min., luego fueron transferidos a la solución de vitrificación (HM con 15 % de etilenglicol (EG) y 15% de dimetilsulfoxido (MeDSO) y sacarosa 0,5M durante 45 a 60 segundos. después los ovocitos se cargaron en cryotop para su vitrificación y someterlos a MIV, FIV, CIV. Debido a ello la tasa de maduración de los ovocitos vitrificados encerrados en cúmulos fueron significativamente mayor con relación al resultado obtenido en ovocitos vitrificados y de control parcialmente desnudos. La vitrificación de ovocitos encerrados en cúmulos según mencionan Zhang et al. (2020), no afectaron su desarrollo de ninguna manera. Los ovocitos conservados con células de cúmulos después de la congelación mostraron mejor conservación mejorada de las topologías normales de cromatina, lo que sugiere que las células de cúmulos proporcionan protección contra el daño crioinducido (Fuku, Kojima, Shioya, et al., 1992).

Para el grupo de vitrificados el porcentaje de COCs inmaduros obtenidos (Tabla 1), fue superior a los resultados reportados en otros estudios como Fuku, Kojima, Shioya, et al. (1992) quienes, alcanzaron el 19% de maduración usando COCs inmaduros de calidad A y B, que fueron sumergidos a una mezcla de 2.0 M de dimetilsulfoxido DMSO, acetamida 0.1 M y propanodiol 3.0M a temperatura ambiente, se cargaron en pajilla de 0.25ML y todo el proceso duró menos de 1 min., esta diferencia de resultados es atribuible en consecuencia como lo menciona el mismo autor a que los oocitos bovinos inmaduros son más sensibles al crioprocesamiento en la etapa GV, porque el daño se hace evidente sólo en el momento de la primera división mitótica.

Por otro lado, Sathananthan et al. (1987) indican que la reorganización de

los microtúbulos del huso es particularmente sensible a la exposición a bajas temperaturas, lo que lleva a que los ovocitos maduren tras la criopreservación en la etapa de vesícula germinal, y que la tasa de clivaje post-fecundación *in vitro* (FIV) sea aún menor. Además, el uso de procedimiento por congelación lenta para ovocitos bovinos resulta en tasas de supervivencia y maduración muy bajas.

Además, se logró mejores resultados a los determinados por Sprícigo et al. (2012) quienes, obtuvieron 45.9%, de maduración testando metil- $\beta$ -ciclodextrina 2mg/ml (MbCD) como cargador de colesterol para cambiar la membrana plasmática del ovocito y aumentar su tolerancia a la criopreservación, demostrando así que con la técnica empleada mejoró la maduración nuclear al reducir la degeneración de los ovocitos después del estrés por frío. Resultado que podría deberse a la manipulación del perfil lipídico de la membrana plasmática al aumentar la concentración del colesterol en la membrana del ovocito y ésta protegería las estructuras celulares del daño causado con el frío.

Así mismo, estos resultados son superiores a los determinados por Sprícigo et al. (2014) quienes, reportaron 55,56% de maduración en la etapa vesícula germinal con el método cryotop, usando diferentes momentos durante la MIV del ovocito: 0(0G0), 8(CG8), 22 (CG22) y 24 horas (CG24), luego fueron vitrificados, desvitrificados y devueltos a IVM hasta completar las 24 horas, se tomó en cuenta la vitrificación a las 22 horas, para su evaluación fueron desnudos, fijados y teñidos con lacmoid, presentando características con un porcentaje mayor en el grupo control seguida de ovocitos vitrificados a 22 horas. Razón por la que los ovocitos vitrificados con 22 horas serían más resistentes al restante, por haber logrado la maduración, por cuanto las células necesitan de cúmulos, hecho que permitiría su eliminación antes de la vitrificación que facilita la entrada de crioprotectores (Zhou et al., 2010). Sin embargo, a pesar de tener bajos resultados, la criopreservación puede utilizarse para la conservación de ovocitos bovinos, mejorando esta técnica probando diferentes asociaciones de crioprotectores, incluyendo compuestos en el ambiente como el uso de proteínas “anticoagulantes” para almacenamiento, reduciendo el volumen de crioprotectores y aumentando la velocidad de congelación.

De igual manera los resultados determinados en el presente estudio son mayores a los resultados que informaron Zhang et al. (2020) quienes, indican que el uso de ovocitos inmaduros vitrificados en LN con 5,6M y 6.6 M, de agentes

crioprotectores, después de la vitrificación y desvitrificación los ovocitos se sometieron a maduración *in vitro* (IVM), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV). Este proceso hace un daño al citoesqueleto afectando la posterior formación del huso meiótico y la extrusión del cuerpo polar. Debido a ello el resultado de 48.10% de maduración, en el ovocito vitrificado en LN 6,6M frente a (LN 5,6M). El mismo autor indica que la vitrificación con LHe afecta la expresión genética de los ovocitos maduros bovinos vitrificados en la etapa VG, principalmente por regulación positiva.

Los resultados igualmente son superiores a Somfai & Hirao, (2021) quienes, testaron un 71.5% de la tasa de maduración utilizando un NCSU-37 libre de proteínas como medio base comparados la eficacia de la vitrificación en el dispositivo Cryotop empleando el protocolo A00, porque se obtuvo una tasa significativamente mayor de ovocitos supervivientes que llegaron hasta la etapa de 8 células después de la FIV en 48 horas, en comparación con el protocolo B. se sugiere que el protocolo A00 es más ventajoso por que aplica EGp PG ¼ 1:1 y la concentración de sacarosa es de 0.4M, mientras el protocolo B00 aplica EGp DMSO 1/4 1:1 la concentración de sacarosa es de 1M. Según el autor la aplicación de pCPA como DMSO, parece ser más toxico para los ovocitos bovinos que el PG.

## 4.2. Clivaje al tercer día (tc3d) y al quinto día (tc5d)

**Tabla 2**

*Tasa de clivaje de ovocitos inmaduros bovinos criollos expuestos a congelación lenta y vitrificación. Ayacucho*

<b>Grupo</b>	<b>Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) Ovocitos (n)</b>	<b>Tasa de clivaje 3er día (%)</b>	<b>Tasa de clivaje 5to día (%)</b>
<b>Frescos</b>	374	363(33.8%) <sup>a</sup>	360(36.0%) <sup>a</sup>
<b>Congelación lenta</b>	206	204(14.7%) <sup>b</sup>	202(19.6%) <sup>b</sup>
<b>Vitrificación</b>	259	254(17.3%) <sup>b</sup>	253(27.9%) <sup>ab</sup>

a, b significan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), mediante la prueba LSD letras iguales no hay diferencias significativas.

En la Tabla 2, se presentan los hallazgos de la crioconservación de ovocitos bovinos inmaduros y se lo compara con ovocitos frescos que a continuación detallo: Como puede observarse al tercer día de congelación lenta, la tasa de escisión fue del 14,7%, mientras que en la vitrificación fue del 17,3%, diferencia que se manifiesta solo numéricamente, pero son estadísticamente inferiores al resultado obtenido con ovocitos frescos (33.8%), porque el material frescos no han sido sometidos a ninguna variación.

A la evaluación realizada al quinto día independiente al tratamiento, la tasa de clivaje experimenta resultado positivo sobre todo en ovocitos vitrificados que aumentaron de 17. 3% a 27.9% sin embargo, a la evaluación estadística los resultados obtenidos al quinto día en ovocitos congelados y vitrificados los resultados son estadísticamente similares. El clivaje al quinto día refleja similitud ( $p < 0.05$ ) entre ovocitos frescos y vitrificados.

Generalmente la vitrificación tiene mayor promedio frente a la congelación lenta, debido a que la vitrificación se asocia con un menor daño al ADN y una mejor preservación de las células estromales (Shi et al., 2017). Ambos métodos muestran una densidad de folículos similares, pero la vitrificación mantiene mejor la calidad histológica (Labrune et al., 2020; Shi et al., 2017).

### 4.2.1. Clivaje por congelación lenta

El porcentaje de Clivaje del 3er y 5to día, obtenidos en el grupo de

congelación lenta fue de 14.74, 19.61% respectivamente. Estos resultados son superiores a los reportados en otros estudios como los de Fuku, Kojima, Shioya, et al. (1992) reportaron el 1.5% de clivaje usando COCs inmaduros de calidad A y B, que fueron sumergidos directamente en 1,2 – propanodiol 2.0 M en suplemento TCM-199, mezclado con albumina sérica bovina al 0.4 % y equilibrado durante 10 a 20 min, incluyendo el tiempo necesario para cargar en pajilla de 0.25ml. Así, esta diferencia de resultados es porque el mismo autor considera que los ovocitos bovinos inmaduros son más sensibles al crioprocésamiento en la etapa GV, porque el daño se hace evidente sólo en el momento de la primera división mitótica, Por otro lado, Sathananthan et al. (1987), indican que la reorganización de los microtúbulos del huso es particularmente sensible a la exposición a bajas temperaturas , lo que lleva a que los ovocitos maduren tras la criopreservación en la etapa de vesícula germinal, y que la tasa de clivaje post-fecundación *in vitro* (FIV) sea aún menor. Además, el uso de procedimiento por congelación lenta para ovocitos bovinos resulta en tasas de supervivencia y clivaje muy bajas.

Los resultados encontrados en el presente estudio son superiores a los presentados por Schellander et al. (1994) quienes, obtuvieron un 12.7 de escisión usando crioprotector (PROH) propilenglicol en diferentes concentraciones (1M; 1,5M), después de la descongelación los ovocitos fueron expuestos al carbohidrato sacarosa una concentración de 0,1 M y 0,25, luego estas fueron llevados al proceso de MIV, FIV y CIV, la investigación indica que el glycerol y PROH, produjeron una escisión significativamente mayor que el DMSO, el uso de carbohidratos durante la rehidratación no produjo ningún efecto beneficioso en el clivaje. Así mismo Lim et al. (1992) observaron que la congelación de ovocitos en VG eran inferiores a los ovocitos maduros debido a la sensibilidad de la disposición de los micro orgánulos que genera un shock por congelamiento, y por la alteración de la actividad de síntesis de proteína, ningunos de los resultados llegaron a mórula o blastocistos.

De otro lado Otoi et al. (1995) reportaron el 7% de escisión derivados de ovocitos inmaduros congelados – descongelados con sacarosa 0.2M usado en combinación con etilenglicol (EG), luego se sigue el proceso de fertilización *in vitro* y cultivo. Para aumentar el porcentaje de ovocitos bovinos que sobrevivieron, la investigación utilizó preequilibrio con sacarosa. Sin embargo,

a los ovocitos inmaduros congelados no les fue mejor en términos de supervivencia o tasas de fertilización.

En el presente trabajo después de la congelación y descongelación fueron evidentes los efectos dañinos, solo hasta la etapa de clivaje, una vez superado este obstáculo, no afectaron el desarrollo posterior de blastocistos.

#### **4.2.2. Clivaje por vitrificación**

El porcentaje de clivaje de día 3er y del día 5to obtenidos en el grupo de vitrificación fue de 17.38, 27.91% respectivamente. Estos resultados son superiores a la investigación de Fuku, Kojima, Shioya, et al. (1992) quienes, reportaron el 0.9% de clivaje usando COCs inmaduros de calidad A y B que fueron sumergidos a una mezcla de 2.0 M de dimetilsulfoxido DMSO, acetamida 0.1 M y propanodiol 3.0M a temperatura ambiente, se cargaron en pajilla de 0.25ml y todo el proceso duró menos de 1 min. esta diferencia de resultados es porque el mismo autor considera que los óvulos bovinos inmaduros son más sensibles al crioprocésamiento en la etapa GV, porque el daño se hace evidente sólo en el momento de la primera división mitótica. Al respecto, Por otro lado, (Sathananthan et al., 1987), indican que la reorganización de los microtúbulos del huso es particularmente sensible a la exposición a bajas temperaturas, lo que lleva a que los ovocitos maduren tras la criopreservación en la etapa de vesícula germinal, y que la tasa de clivaje post-fecundación *in vitro* (FIV) sea aún menor. Además, el uso de procedimiento por congelación lenta para ovocitos bovinos resulta en tasas de supervivencia y clivaje muy bajas.

Asimismo estos resultados son superiores a los reportados por Matsumoto et al. (2001) quienes, testaron el uso de las técnicas de una rejilla EM, la malla de nailon (10-20), o malla de nailon (40-65) como nuevos recipientes, para el proceso vitrificación, el cual obtuvo diferentes porcentajes de clivaje 7, 10 y 13% respectivamente para cada técnica, el desarrollo fue mínimo debido a que estos ovocitos bovinos después de la vitrificación son muy sensibles al frío y de acuerdo a lo que informó el autor no llegaron a desarrollar hasta la etapa de blastocistos.

Los resultados del presente estudio por otro lado son similares a los reportados por Sprícigo et al. (2012) quienes, reportaron 24,4%, de clivaje, testando metil- b- ciclodextrina 2mg/ml (MbCD) como cargador de colesterol para

cambiar la membrana plasmática del ovocito y aumentar su tolerancia a la criopreservación, ésta mejora la maduración nuclear al reducir la degeneración de los ovocitos después del estrés por frío. Podría deberse también a la manipulación del perfil lipídico de la membrana plasmática al aumentar la concentración del colesterol en la membrana del ovocito. Horvath & Seidel (2006) encontraron diferencias significativas en escisión y embriones de 8 células cuando se utilizó MbCD cargado, estas desaparecieron gradualmente en la etapa de blastocistos.

También son similares a los encontrados por Sprícigo et al. (2014) quienes, obtuvieron 24.19% de clivaje con el método cryotop, usando diferentes momentos durante la MIV del ovocito: 0(0G0), 8(CG8), 22 (CG22) y 24 horas (CG24), luego fueron vitrificados, desvitrificados y devueltos a IVM hasta completar las 24 horas, se tomó en cuenta la vitrificación a las 22 horas, para su evaluación fueron desnudos, fijados y teñidos con lacmoid, presentando características con un porcentaje mayor en el grupo control seguida de ovocitos vitrificados a 22 horas. Razón por la que los ovocitos vitrificados con 22 horas. sería más resistente que el resto, al estar ya madurados, no la mayoría necesita células de cúmulos, hecho que permitirá su eliminación antes de vitrificar (Zhou et al., 2010). facilita la entrada de Crioprotectores. Estos resultados sugieren que las bajas tasa de clivaje no se debían a problemas de penetración, sino más bien a las altas tasas de degeneración de los ovocitos ya en el momento de fertilización.

De otro lado, resultan inferiores a los reportados por Zhou et al. (2010) quienes, reportan haber determinado 65.8% de tasa de escisión usando la solución de equilibrio (HM) que contenía 7,5 % de etilenglicol (EG) y 7,5% de dimetilsulfoxido (MeDSO) durante "15 min", luego fueron transferidos a la solución de vitrificación (HM) que contenía 15 % de etilenglicol (EG) y 15% de dimetilsulfoxido (MeDSO) y sacarosa 0,5M durante 45 a 60 s, luego los ovocitos se cargaron en cryotop para su vitrificación, para someterlos a MIV, FIV, CIV. Debido a ello la tasa de escisión de los ovocitos vitrificados encerrados en cúmulos fueron significativamente mayor que el de los ovocitos vitrificados y de control parcialmente desnudos. Zhang et al. (2009) indican que la vitrificación de ovocitos encerrados en cúmulos no encontró diferencias en el desarrollo de ovocitos MII ovinos vitrificados con o sin células de cúmulos.

También son inferiores a los resultados determinados por Zhang et al. (2020) quienes, informaron que el uso de ovocitos inmaduros vitrificados en nitrógeno líquido (LN, por sus siglas en inglés) con 5,6M y 6.6 M, de agentes crioprotectores, después de la vitrificación y desvitrificación los ovocitos se sometieron a maduración *in vitro* (IVM), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV). Este proceso hace un daño al citoesqueleto afectando la posterior formación del huso meiótico y la extrusión del cuerpo polar. Debido a ello el resultado de 34.95% de clivaje, en el ovocito vitrificado en LN 6,6M frente a (LN 5,6M), los mismos autores indican que la vitrificación con helio líquido (LHe, por sus siglas en inglés) afecta la expresión genética de los ovocitos maduros bovinos vitrificados en la etapa VG, principalmente por regulación positiva.

Resultado de similar tendencia son lo reportados por Somfai & Hirao (2021) quienes, obtuvieron un 68.9% de la tasa de escisión utilizando un NCSU-37 libre de proteínas como medio base, comparamos la eficacia de la vitrificación en el dispositivo Cryotop empleando el protocolo A00, porque se obtuvo una tasa significativamente mayor de ovocitos supervivientes que llegaron hasta la etapa de 8 células después de la FIV en 48 horas, en comparación con el protocolo B. se sugiere que el protocolo A00 es más ventajoso por que aplica EGp PG ¼ 1:1 y la concentración de sacarosa es de 0.4M, mientras el protocolo B00 aplica EGp DMSO 1/4 1:1 la concentración de sacarosa es de 1M. Según el autor la aplicación de pCPA como DMSO, parece ser más toxico para los ovocitos bovinos que el PG.

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio son inferiores a los datos reportados por Prentice Biensch et al. (2012) quienes, informaron 40.9% de clivaje exponiendo a los ovocitos a VS1 y VS2, estas se cargaron en NL, luego se calentaron en TCM .199 +1,7% de sacarosa +20% suero de ternera en 37C, durante 1min en la etapa GV, debido a que se vitrificaron con células de cúmulos cerrados que mantienen viables todo el proceso de FIV y CIV. En este estudio el DMSO Y EG no tuvieron efecto adversos ni tóxicos sobre los ovocitos bovinos, aunque todavía hay considerable debate, de la literatura publicada tiende a confirmar la probabilidad de que estos crioprotectores no sean altamente tóxicos. (Prentice Biensch et al., 2012).

#### 4.3. Calidad de blastocistos (tcb)

**Tabla 3**

*Tasa de calidad de blastocisto de ovocitos bovinos criollos criopreservados en congelación lenta y vitrificación. Ayacucho*

<b>Grupo</b>	<b>Cigotos cultivados (n)</b>	<b>Blastocistos viables (%)</b>	<b>Calidad de blastocistos (%)</b>
<b>Frescos</b>	363	139(35.3%) <sup>a</sup>	132(33.6%) <sup>a</sup>
<b>Congelación lenta</b>	204	73(16.9%) <sup>b</sup>	61(14.3%) <sup>b</sup>
<b>Vitrificación</b>	254	81(20.1%) <sup>b</sup>	80(18.6%) <sup>b</sup>

a, b significan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), mediante la prueba LSD

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para viabilidad y calidad de blastocistos, luego de la crioconservación de ovocitos inmaduros de bovinos; en general los resultados tienen una tendencia similar a los determinados para las otras dos variables.

Como puede apreciarse el mayor porcentaje el 35.3%, para blastocistos viables corresponde al estudio conducido con material fresco y esta diferencia resulta estadísticamente distinta a lo determinado para material previamente modificado (congelamiento, vitrificación). Los ovocitos frescos en esta etapa también mostraron mejores porcentajes que los dos métodos de criopreservación ( $p < 0.05$ ) porque no fueron sometidos a ninguna variación. Generalmente la vitrificación tiene mayor promedio frente a la congelación lenta, debido a que la vitrificación se asocia con un menor daño al ADN y una mejor preservación de las células estromales (Shi et al., 2017). Ambos métodos muestran una densidad de folículos similares, pero la vitrificación tiene mejor la calidad histológica (Labruno et al., 2020; Shi et al., 2017).

##### **4.3.1. Tasa y calidad de blastocistos por congelación lenta**

La tasa y calidad de blastocistos obtenidos en el grupo de congelación lenta fue de 16.9% y 14.3% respectivamente. Fuku, Kojima, Shioya, et al. (1992) informaron que los oocitos bovinos inmaduros son más sensibles al crioprocesamiento en la etapa GV, porque el daño se hace evidente sólo en el momento de la primera división mitótica, por lo tanto, pocos ovocitos bovinos

maduraron después de la criopreservación en la etapa GV y aún menos se escindieron después de la FIV. Schellander et al. (1994) indica que la concentración de agentes crioprotectores y la presencia de carbohidratos no son claves para la criopreservación de ovocitos.

Otoi et al. (1995) reportaron 0.9% de blastocistos derivados de ovocitos inmaduros congelados – descongelados con sacarosa 0.2M usado en combinación con etilenglicol (EG), luego se sigue el proceso de fertilización *in vitro* y cultivo. En el estudio se añadió la preequilibración con sacarosa para la mejora de la tasa de supervivencia y fertilización de los ovocitos inmaduros congelados como resultado una preñez de la novilla inseminada.

En el presente trabajo después de la congelación y descongelación fueron evidentes los efectos dañinos, solo hasta la etapa de clivaje, una vez superado este obstáculo, no afectaron el desarrollo posterior de blastocistos, por esta razón se alcanzó a obtener blastocistos viables y calidad de blastocistos.

#### **4.3.2. Tasa y calidad de blastocistos por vitrificación**

La tasa y calidad de blastocistos obtenidos en el grupo de vitrificación fue de 20.1% y 18.6% respectivamente. Estos resultados son superiores a lo informado por Prentice Biensch et al. (2012) quienes, reportaron 1.6% de blastocistos exponiendo a los ovocitos a VS1 y VS2, estas se cargaron en NL, luego se calentaron en TCM .199 +1,7% de sacarosa +20% suero de ternera en 37C, durante 1min en la etapa GV, debido a que el tiempo de exposición de “45 s” a “60 s” no fue suficiente para que estos crioprotectores penetraran dentro del ovocito bovino, o si fueron penetrados el DMSO y EG no tuvieron efecto adversos ni tóxicos, aunque todavía hay considerable debate, de la literatura publicada que tiende a confirmar la probabilidad de que estos crioprotectores no sean altamente tóxicos (Prentice Biensch et al., 2012).

De otro lado el resultado del presente estudio es superior a lo reportado por Zhang et al. (2020) quienes, obtuvieron 7.61% de blastocistos, mediante el uso de ovocitos inmaduros vitrificados en LN con 5,6M y 6.6 M, de agentes crioprotectores. Este proceso hace un daño al citoesqueleto afectando la posterior formación del huso meiótico y la extrusión del cuerpo polar.

Los resultados por otro lado son similares a los reportados en otros estudios. Tal es el caso de Sprícigo et al. (2014) quienes, reportaron 19.23% de blastocistos en la etapa vesícula germinal con el método Cryotop, usando

diferentes momentos durante la MIV del ovocito: 0(CG0), 8(CG8), 22 (CG22) y 24 horas (CG24), luego fueron vitrificados - desvitrificados y devueltos a IVM hasta completar las 24 horas, se tomó en cuenta la vitrificación a las 22 horas, para su evaluación fueron desnudados, fijados y teñidos con lacmoid, presentando características con un porcentaje mayor en el grupo control seguido de ovocitos vitrificados a 22 horas. Razón por la que los ovocitos vitrificados con 22 horas serían más resistentes que el resto, al estar maduros, no necesitan células de cúmulos, hecho que permitirá su eliminación antes de vitrificar facilitando la entrada de crioprotectores (Zhou et al., 2010). Estos resultados sugieren que las bajas tasas en blastocistos no se debían a problemas de penetración, sino más bien a las altas tasas de degeneración de los ovocitos ya en el momento de fertilización.

Al que también puede agregarse los resultados de Somfai & Hirao (2021) quienes, reportaron 23% de blastocistos y 11.5% calidad de blastocistos, utilizando un NCSU-37 libre de proteínas como medio base, comparamos la eficacia de la vitrificación en el dispositivo Cryotop empleando el protocolo A00, Según el autor la aplicación de pCPA como DMSO, parece ser más tóxico para los ovocitos bovinos que el PG.

Finalmente Zhou et al. (2010) reportaron haber determinado 18% de blastocistos viables y superior a la calidad de blastocistos que obtuvo el 11.3% respectivamente, usando la solución de equilibrio (HM) que contenía 7,5 % de etilenglicol (EG) y 7,5% de dimetilsulfoxido (MeDSO) durante "15 min", luego fueron transferidos a la solución de vitrificación que contenía 15 % de etilenglicol (EG) y 15% de dimetilsulfoxido (MeDSO) y sacarosa 0,5M durante "45s" a "60 s" luego los ovocitos se cargaron en cryotop para su vitrificación, para someterlos a MIV, FIV, CIV. Debido a ello la tasa de blastocistos de los ovocitos vitrificados encerrados en cúmulos fueron significativamente mayor que el de los ovocitos vitrificados y de control parcialmente desnudos.

Sin embargo, los resultados son inferiores a los informados por Sprícigo et al. (2012) quienes reportaron el 34.9 de blastocistos viables y superiores en cuanto a la calidad de blastocistos 6.3%, testando metil- b- ciclodextrina 2mg/ml (MbCD) como cargador de colesterol para cambiar la membrana plasmática del ovocito y aumentar su tolerancia a la Criopreservación.

#### 4.4. Eficacia de los métodos de criopreservación sobre los embriones viables

**Tabla 4**

*Eficacia de los blastocistos viables criopreservados en congelación lenta y vitrificación. Ayacucho*

<b>Grupo</b>	<b>Eficacia de blastocisto viable</b>	<b>Zhou et al (2010)</b>	<b>Sprícigo et al (2014)</b>	<b>Sprícigo et al (2012)</b>	<b>Zhang et al (2020)</b>	<b>Sonfai et al (2021)</b>	<b>Otoi et al (2011)</b>
<b>Frescos</b>	0.90	0.83	0.95	0.92	1.02	1.28	1.0
<b>Congelados</b>	0.19						1.0
<b>Vitrificados</b>	0.98	0.88	0.94	1.70	0.37	1.12	

A la comparación de la eficacia de los métodos de conservación sobre embriones viables (Tabla 4) es evidente que el tratamiento usado como control (frescos) es semejante cuando es comparado con los vitrificados, pero en ambos hay diferencia respecto a los congelados; adicionalmente, encontramos que los vitrificados tienen una mayor eficacia respecto a los congelados.

Cuando se usa crioconservación de congelación lenta, la respuesta de los blastocistos viables se reduce después de la vitrificación de ovocitos bovinos en la etapa de vesícula germinal. En este caso los resultados de eficacia de vitrificación es 0.98 y en congelación lenta es 0.19, semejante a lo reportado por otros autores como Zhou et al. (2010), Sprícigo et al. (2012), Zhang et al.(2020), Somfai & Hirao, (2021), que han obtenido 0.88,0.94,1.7,0.37,1.12, de eficiencia en vitrificación y Otoi et al., (1995) obtuvo 1.00 en congelación lenta; estos resultados de tendencia estadísticamente similar indican la eficacia de la vitrificación , comparada con la congelación en la Criopreservación, que difieren según el material biológico, y la vitrificación suele mostrar resultados mayores porque produce una mayor integridad de la membrana y un menor estrés oxidativo en la célula, debido a que este método implica un enfriamiento rápido, lo que produce un estado vitreo que minimiza la formación de cristales de hielo, en comparación con la congelación lenta que presentó un daño celular, como

este enfoque convencional permite un enfriamiento lento, a menudo da como resultado la formación de cristales de hielo, lo que puede dañar las células. Una de las varias opciones para los ovocitos bovinos criopreservados es la vitrificación, que es rápida, barata y fácil; por el contrario, la congelación lenta, si bien es menos eficiente en algunos contextos, pero puede ser preferible para ciertas aplicaciones, como la preservación de espermatozoides aviar, donde demostró una mejor retención de la motilidad (Vásquez Paredes, 2021).

## V. CONCLUSIONES

1. La tasa de maduración de ovocitos bovinos fue del 78.6% con congelación lenta y del 77% con vitrificación, mostrando diferencias significativas frente al 98.2% de los ovocitos frescos.
2. Al evaluar la tasa de clivaje a los tres y cinco días tras la congelación y descongelación, los resultados de vitrificación (17.3% y 27.9%) son similares a los de la criopreservación por congelación lenta (14.7% y 19.6%), sin diferencias significativas.
3. El método de criopreservación por vitrificación presentó tasas y calidad de blastocistos de 20.1% y 18.6%, respectivamente, mientras que la congelación lenta mostró 16.9% y 14.3%. No se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos
4. La evaluación de los métodos de criopreservación de ovocitos para posteriormente obtener blastocistos viables concluye que la vitrificación de ovocitos es superior que la congelación lenta en términos de eficacia. Aunque ambos métodos necesitan mejorarse para compararse con la producción de embriones a partir de ovocitos frescos.

## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda buscar alternativas diversas de sustratos que intervienen en las diferentes etapas de cada técnica de criopreservación de ovocitos.
- Se recomienda realizar otros trabajos de investigación utilizando otros métodos y dispositivos para criopreservación.
- En congelación lenta utilizar diferentes niveles de temperatura de congelación de ovocitos.
- Para vitrificación de ovocitos se recomienda utilizar otros insumos que faciliten la congelación- descongelación.
- Sería bueno trabajar y comparar con la criopreservación a partir de ovocitos madurados *in vitro*, dado que las células del cúmulo del ovocito podrían tener cierta influencia en el proceso de criopreservación.
- Se recomienda trabajar en diversos ecotipos de ganado criollo; así también, con diferentes edades, diferentes cruces con otras razas; así como incorporar otros factores como: la época del año, sistema de crianza, alimentación, nutrición, altitud entre otros.
- Se recomienda realizar más investigaciones de criopreservación de ovocitos inmaduros ya que la mayoría de trabajos se han realizado en criopreservación de espermatozoides y en embriones ya producidos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albarracín Monje, J. L. (2005). Vitricación de ovocitos bovinos mediante la técnica Open Pulled Straw: Estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro Ph.D. Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona. <https://www.tdx.cat/handle/10803/5729>
- ARAV, A. (2000). A new device method for vitricación increase the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 53, 248. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573387451031938176>
- Bajo Arenas, J. M. (2009). *Fundamentos de reproducción*. Ed. Médica Panamericana.
- Barba Cáceres, E. M. (2016). *Evaluación de dos crioprotectores en la congelación de embriones bovinos producidos in vitro, en medios sintéticos*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/26153>
- Cabrera, P., & Fernandez, A. (2006). Criopreservación de Embriones: Una herramienta básica en la Reproducción Asistida. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 47(2), 59-70. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0258-65762006000200001&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-65762006000200001&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Carolan, C., Lonergan, P., Monaghan, P., Gallagher, M., & Gordon, I. (1994). Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology*, 41(5), 1061-1068. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(05\)80029-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(05)80029-9)
- Celestinos, M., & Gatica, R. (2002). Vitricación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Archivos de medicina veterinaria*, 34(2), 157-165. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200002>
- Cevallos Falquez, O., Barba, C., Delgado, J. V., González, A., Perea, J., Angón, E., & García, A. (2016). Caracterización zoométrica y morfología del ganado criollo de Manabí (Ecuador). *Revista Científica*, XXVI(5), 313-323. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95949758008>
- Crespo Calva, J. L., & Guamán Gutiérrez, E. G. (2015). *Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano*

utilizando el protocolo de Genes Diffusion.  
<https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/7f33e203-b4f0-461f-85d8-5fbf9872e24f/content>

- Cruz Negrete, J. F. (2015). *Evaluación de la crioconservación de ovocitos en conejos (Oryctolagus cuniculus) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi*. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2878>
- Delgado Fernández, R. C. (2017). *Maduración in vitro de ovocitos en metafase II de vacas post mortem a través de la técnica de fijación*. Tesis M.Sc. UNALM. Perú. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/2942>
- Delgado, J. V. (2012). *Conservación y utilización de los recursos genéticos de los animales de granja*. Tesis, Universidad de Córdoba. [http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo\\_110\\_lin\\_photo/articulos/2012/Trabajo042\\_AICA2012.pdf](http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2012/Trabajo042_AICA2012.pdf)
- Dias Gonçalves, P. B., Henrique Barreta, M., Ricardo Sandri, L., Ferreira, R., & Quites Antoniazzi, A. (2007). *Produção in vitro de embriões bovinos: O estado da arte*. 31(2), 6. <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/212.pdf>
- Díez Monforte, C., Muñoz Llamosas, M., Caamaño, J. N., & Gómez Piñeiro, E. (2010). Biotecnologías reproductivas: Producción y criopreservación de embriones bovinos «in vitro». *Tecnología agroalimentaria: Boletín informativo del SERIDA*, 8, 41-46. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3357876>
- Do, V. H., & Taylor-Robinson, A. W. (2020). Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos by vitrification: In pursuit of a simplified, standardized procedure that improves pregnancy rates to promote cattle industry use. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 36(3), 251-270. <https://doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1450-91562003251D>
- Downs, S. M., Daniel, S. A. J., Bornslaeger, E. A., Hoppe, P. C., & Eppig, J. J. (1989). Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: Modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. *Gamete Research*, 23(3), 323-334. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120230309>
- Duque, P., Hidalgo, C. O., Gómez, E., Pintado, B., Facal, N., & Díez, C. (2003). *Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water*

- source *Effects on bovine in vitro embryo development and quality. Reproduction Nutrition Development*, 43(6), 487-496  
<https://doi.org/10.1051/rnd2004007>
- Edashige, K., Asano, A., An, T. Z., & Kasai, M. (1999). Restoration of Resistance to Osmotic Swelling of Vitrified Mouse Embryos by Short-Term Culture. *Cryobiology*, 38(4), 273-280. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2163>
- Emiliani, S., Van den Bergh, M., Vannin, A. S., Biramane, J., & Englert, Y. (2000). Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 15(4), 905-910. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.4.905>
- Fabri, R., Porcu, E., Marsella, T., Rocchetta, G., Venturoli, S., & Flamigni, C. (2001). Human oocyte cryopreservation: New perspectives regarding oocyte survival. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 16(3), 411-416. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.3.411>
- Fernández, A., Díaz, T., & Muñoz, G. (2007). Producción In vitro de Embriones Bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 48(1), 51-60. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0258-65762007000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-65762007000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Fuku, E., Kojima, T., & Shioya, T. (1992). *Fertilización In Vitro y Desarrollo de Congelados— Descongelados Ovocitos bovinos.*
- Fuku, E., Kojima, T., Shioya, Y., Marcus, G. J., & Downey, B. R. (1992). In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*, 29(4), 485-492. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90051-3)
- Fukui, Y., Sonoyama, T., Mochizuki, H., & Ono, H. (1990). Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 34(3), 579-591. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(90\)90013-j](https://doi.org/10.1016/0093-691x(90)90013-j)
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lagutina, I., & Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59(2), 599-616. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01243-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01243-8)

- Gordon, I., & Lu, K. H. (1990). Production of embryos in vitro and its-impact on livestock production. *Theriogenology*, 33(1), 77-87. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90599-O](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90599-O)
- Greve, T., & Madison, V. (1991). In vitro fertilization in cattle: A review. *Reproduction Nutrition Development*, 31(2), 147-157. <https://hal.science/hal-00899399>
- Guerra, R., Solis, A., Sandoya, G., & Armas, R. de. (2012). Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vivo e in vitro. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(10). <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63624631005>
- Gutiérrez, J. P., Rodríguez, Y. U., Pirela, A. P., Contreras, F. B., Monreal, P. V., & Fonseca, H. H. (2012). Influencia de la predominancia racial sobre la competencia de maduración, fecundación y desarrollo in vitro de ovocitos bovinos. *Revista de la Universidad del Zulia*, 3(5), Article 5. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/rluz/article/view/12672>
- Horvath, G., & Seidel, G. E. (2006). Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Theriogenology*, 66(4), 1026-1033. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.004>
- INEI. (2014). *PERÚ Instituto Nacional de Estadística e Informática*. [http://webinei.inei.gob.pe/anda\\_inei/index.php/catalog/710](http://webinei.inei.gob.pe/anda_inei/index.php/catalog/710)
- INEI, C. (2012). *IV Censo Nacional Agropecuario 2012* (IV Censo Nacional Agropecuari, p. 63). Ministerio de Agricultura y Riego. <https://proyectos.inei.gob.pe/web/DocumentosPublicos/ResultadosFinale sIVCENAGRO.pdf>
- INEI, & MINAGRI. (2013). *IV Censo Nacional- Resultados Definitivos—IV Censo Nacional Agropecuario 2012*. <https://sinia.minam.gob.pe/sites/default/files/sinia/archivos/public/docs/3449.pdf>
- INTA. (2010). ¿Por qué y para qué producir embriones bovinos in vitro? En *Visión Rural 29* (143): 25-27 (julio-agosto 2022) [Info:ar-repo/semantics/artículo]. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA. <https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/12994>
- Kasai, M., Hamaguchi, Y., Zhu, S. E., Miyake, T., Sakurai, T., & Machida, T. (1992). High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene

- glycol-based solution by a simple method. *Biology of Reproduction*, 46(6), 1042-1046. <https://doi.org/10.1095/biolreprod46.6.1042>
- Kuleshova, L., Gianaroli, L., Magli, C., Ferraretti, A., & Trounson, A. (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: Case report. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 14(12), 3077-3079. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.12.3077>
- Labrune, E., Jaeger, P., Santamaria, C., Fournier, C., Benchaib, M., Rabilloud, M., Salle, B., & Lornage, J. (2020). Cellular and Molecular Impact of Vitrification Versus Slow Freezing on Ovarian Tissue. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 26(5), 276-285. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2020.0063>
- Lim, J. M., Fukui, Y., & Ono, H. (1992). Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*, 37(2), 351-361. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90193-U](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90193-U)
- Lonergan, P., Pedersen, H. G., Rizos, D., Greve, T., Thomsen, P. D., Fair, T., Evans, A., & Boland, M. P. (2004). Effect of the Post-Fertilization Culture Environment on the Incidence of Chromosome Aberrations in Bovine Blastocysts<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 71(4), 1096-1100. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030635>
- Lonergan, P., Rizos, D., Kanka, J., Nemcova, L., Mbaye, A. M., Kingston, M., Wade, M., Duffy, P., & Boland, M. P. (2003). *Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality*. 337-346. <https://acortar.link/Np2p2d>
- Matilla Pinto, E. (2017). *Implicación de la adición de N-acetilcisteína en los medios de cultivo de gametos y embriones criopreservados* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad de Extremadura]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=148497>
- Matsumoto, H., Jiang, J. Y., Tanaka, T., Sasada, H., & Sato, E. (2001). Vitrification of Large Quantities of Immature Bovine Oocytes Using Nylon Mesh. *Cryobiology*, 42(2), 139-144. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2309>
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 247(3), C125-C142. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>

- Miyake, T., Kasai, M., Zhu, S. E., Sakurai, T., & Machida, T. (1993). Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology*, *40*(1), 121-134. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(93\)90346-7](https://doi.org/10.1016/0093-691x(93)90346-7)
- Mucci, N., Aller, J. F., Kaiser, G. G., Hozbor, F., & Alberio, R. H. (2006). Producción in vitro de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de medicina veterinaria*, *38*(2), 97-104. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200002>
- Nucci, N. (2012). *Estado actual, proyecciones y perspectivas de la fertilización in vitro (FIV) en la ganadería bovina en Colombia*. <http://repository.unad.edu.co/handle/10596/21321>
- Ohboshi, S., Fujihara, N., Yoshida, T., & Tomogane, H. (1997). Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of in vitro-derived bovine blastocysts. *Animal Reproduction Science*, *48*(1), 27-36. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(97\)00034-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(97)00034-1)
- Oriundo Núñez, K. P. (2018). *Sobrevivencia de blastocistos bovinos in vitro en dos métodos de criopreservación*. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/3604>
- Orzuna Olivan, G. R. (2015). *Producción in vitro de embriones en bovino*. <https://repositorio.uaaan.mx/xmlui/handle/123456789/6713>
- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., & Sukuki, T. (1995). *In Vitro Fertilization and Development of immature and Mature Bovine Oocytes Cryopreserved by Ethylene Glycol with Sucrose*.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eystone, W. H., & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, *25*(4), 591-600. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90143-3)
- Peláez Peláez, V. A. (2011). *Producción in vitro de embriones bovinos*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3053>
- Prentice Biensch, J. R., Singh, J., Mapletoft, R. J., & Anzar, M. (2012). Vitrification of immature bovine cumulus-oocyte complexes: Effects of cryoprotectants, the vitrification procedure and warming time on cleavage and embryo development. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *10*, 73. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-73>

- Primo, A. T. (1992). El ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después. *Archivos de zootecnia*, 41(154), 13. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=278746>
- Pugh, P. A., Tervit, H. R., & Niemann, H. (2000). Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Animal Reproduction Science*, 58(1-2), 9-22. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(99\)00087-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(99)00087-1)
- Ramón Ugalde, J., & Cervera Paul, D. (2015). *Contribución de la biotecnología reproductiva a la biodiversidad* (p. 3). <https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap9/09%20Contribucion%20de%20la%20biotecnologia.pdf>
- Reyes, M. (2010). Fecundación In Vitro: Una nueva reproducción. *TecnoVet*, 1(2), Article 2. <https://tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/5311>
- Sathananthan, A. H., Trounson, A., & Freeman, L. (1987). Morphology and fertilizability of frozen human oocytes. *Gamete Research*, 16(4), 343-354. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120160408>
- Schellander, K., Peli, J., Schmoll, F., & Brem, G. (1994). Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmaturred bovine oocytes. *Theriogenology*, 42(6), 909-915. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90114-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90114-X)
- Schneider, U., & Mazur, P. (1984). Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 21(1), 68-79. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90307-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90307-8)
- Serrano Novoa, C. A., Sierra, R., Sánchez, J. E., Restrepo Betancur, L. F., & Olivera Ángel, M. (2002). Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones producidos in vitro. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 15(3), 286-292. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3242403>
- Shaw, J. M., Ward, C., & Trounson, A. O. (1995). Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. *Human Reproduction*

- (Oxford, England), 10(2), 396-402.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a135951>
- Shi, Q., Xie, Y., Wang, Y., & Li, S. (2017). Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 8538. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09005-7>
- Sirard, M. A., Coenen, K., & Bilodeau, S. (1992). Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, 37(1), 39-57. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90246-N](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90246-N)
- Somfai, T., & Hirao, Y. (2021). Vitrification of immature bovine oocytes in protein-free media: The impact of the cryoprotectant treatment protocol, base medium, and ovary storage. *Theriogenology*, 172, 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.05.029>
- Sprícigo, J. F. W., Morais, K., Ferreira, A. R., Machado, G. M., Gomes, A. C. M., Rumpf, R., Franco, M. M., & Dode, M. A. N. (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. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.015>
- Sprícigo, J. F. W., Morais, K. S., Yang, B. S., & Dode, M. A. N. (2012). Effect of the exposure to methyl- $\beta$ -cyclodextrin prior to chilling or vitrification on the viability of bovine immature oocytes. *Cryobiology*, 65(3), 319-325. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.09.001>
- Stringfellow, D. A., & Seidel, S. M. (2000). *Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones: Guia de Procedimientos e Informacion General para el Uso de la Tecnologia de la Transferencia de Embriones con Especial Enfasis*. International Embryo Transfer Society.
- Sulca Ñaupas, L. V. (2017). “Viabilidad post descongelación de ovocitos en bovinos criollos según diámetro folicular Ayacucho 2750 m.s.n.m—2016”. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2644>
- Thompson, J. g., Sherman, A. n. m., Allen, N. w., McGowan, L. t., & Tervit, H. r. (1998). Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 50(2),

- 139-145. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199806\)50:2<139:AID-MRD3>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199806)50:2<139:AID-MRD3>3.0.CO;2-L)
- Vales García, J. J. (1984). *Criopreservadores concepto y manejo*. Criopreservadores concepto y manejo. [https://scholar.google.es/citations?view\\_op=view\\_citation&hl=es&user=y-iq3zQAAAAJ&citation\\_for\\_view=y-iq3zQAAAAJ:-6RzNnnwWf8C](https://scholar.google.es/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=y-iq3zQAAAAJ&citation_for_view=y-iq3zQAAAAJ:-6RzNnnwWf8C)
- Van Soom, A., Van Vlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A. R., Deluyker, H., & de Kruif, A. (1992). Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*, 38(5), 905-919. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90165-N](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90165-N)
- Vásquez Paredes, O. F. (2021). *Evaluación de la crioconservación espermática en líneas de gallos criollos con glicerol al 8% como alternativa para el mejoramiento genético*. <https://dspace.ucacue.edu.ec/handle/ucacue/17778>
- Verduzco, J. M. R., Herrera-Camacho, J., Cajero-Juárez, M., Navarro-Maldonado, M. C., & García-Valladares, A. (2009). Evaluación de dos medios de maduración in vitro para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 95-99. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911243009>
- Voelkel, S. A., & Hu, Y. X. (1992). Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*, 37(3), 687-697. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90148-K](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90148-K)
- Von Baer Hepp, A. B. (2004). *"Participación en 4º Simposio Europeo sobre Camélidos Sudamericanos y Seminario Europeo de DECAMA*. 1-45. <https://bibliotecadigital.fia.cl/server/api/core/bitstreams/fa5c1a67-c38e-43cb-9ea2-94130a46a4bb/content>
- Watanabe, M. R., Lôbo, R. B., Franceschini, P. H., Dayan, A., Vila, R. A., Galerani, M. a. V., & Watanabe, Y. F. (1998). Produção in vitro de embriões por sessão de aspiração em fêmeas nelore. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, 26. <https://repositorio.usp.br/item/001029075>
- Zárate Guevara, O. E. (2006). *Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos*. <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/9755>

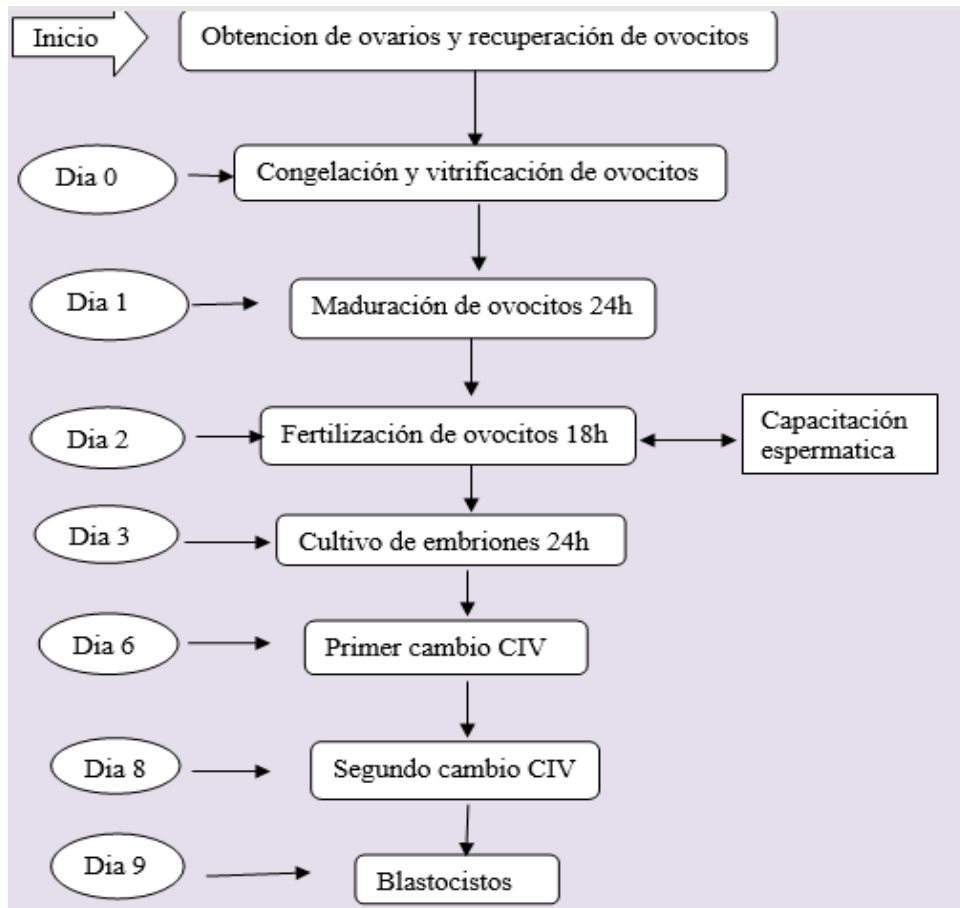
- Zeron, Y., Pearl, M., Borochoy, A., & Arav, A. (1999). Kinetic and Temporal Factors Influence Chilling Injury to Germinal Vesicle and Mature Bovine Oocytes. *Cryobiology*, 38(1), 35-42. <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2139>
- Zhang, F., Zhang, Z.-Y., Cai, M.-D., Li, X.-X., Li, Y.-H., Lei, Y., & Yu, X.-L. (2020). Effect of vitrification temperature and cryoprotectant concentrations on the mRNA transcriptome of bovine mature oocytes after vitrifying at immature stage. *Theriogenology*, 148, 225-235. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.006>
- Zhou, X. L., Al Naib, A., Sun, D. W., & Lonergan, P. (2010). Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. *Cryobiology*, 61(1), 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.05.002>

## **ANEXOS**

### Anexo 1. Matriz de Consistencia

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VAR. E INDICADORES	METODOLOGIA
<p><b>Problema general:</b> ¿Cuál es el efecto de los métodos de criopreservación en el desarrollo <i>in vitro</i> de embriones provenientes de ovocitos bovinos criollos?</p> <p><b>Problema secundario:</b> ¿Cuál es la tasa de maduración ovocitaria, de clivaje, de blastocistos a partir de ovocitos criopreservados mediante la congelación lenta y vitrificación?</p> <p>¿Cuál de los dos métodos de crio preservación presentan mayor eficacia para determinar mayores tasas de embriones viables en cuanto a su tinción?</p>	<p><b>Objetivo general:</b> Determinar el efecto de los métodos de criopreservación en el desarrollo <i>in vitro</i> de embriones provenientes de ovocitos bovinos criollos.</p> <p><b>Objetivos específicos:</b> Determinar la tasa de maduración ovocitaria, de clivaje, de blastocistos y calidad de blastocistos a partir de ovocitos criopreservados mediante efecto de la congelación lenta y vitrificación.</p> <p>Determinar cuál de los dos métodos de crio preservación presenta mayor eficacia para lograr mayores tasas de embriones viables en cuanto a su tinción.</p>	<p><b>Hipótesis general:</b> Los métodos de criopreservación afectan en el desarrollo <i>in vitro</i> de embriones provenientes de ovocitos bovinos criollos</p> <p><b>Hipótesis específicas:</b> La criopreservación congelación lenta y vitrificación del ovocito bovino criollo influye sobre la maduración del ovocito, el clivaje, producción de blastocistos y su calidad. Existen diferencias entre los métodos de criopreservación de ovocitos bovinos criollos con respecto al desarrollo <i>in vitro</i> de embriones.</p>	<p><b>Variable independiente:</b> <b>Métodos de criopreservación de ovocitos bovinos.</b></p> <p><b>Indicadores:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Congelación lenta</li> <li>• Vitrificación.</li> </ul> <p><b>Variable dependiente:</b> <b>Desarrollo de embriones bovinos producidos <i>in vitro</i>.</b></p> <p><b>Indicadores:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tasa de maduración ovocitaria, (%)</li> <li>• Tasa de clivaje(%)</li> <li>• Tasa de Blastocistos(%)</li> <li>• Calidad de blastocistos, (1, 2)</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Tipo Investigación: experimental</li> <li>2) Nivel de Investigación: Aplicativo</li> <li>3) Método: Correlacional</li> <li>4) Diseño Completamente aleatorizado (DCA) balanceado con efectos fijo y formula de eficacia</li> <li>5) Población: Ovarios</li> <li>6) Muestra : 1319 ovocitos de categoría A y B</li> <li>7) Técnica: observación directa del estudio, registro de información sobre su comportamiento</li> <li>8) Instrumentos: cuaderno de campo y ficha de registro y lista de cotejo</li> </ol>

**Anexo 2.** Proceso de producción de blastocistos por congelación lenta y vitrificación



**Anexo 3. Proceso de elaborar la parte estadística del trabajo**

<b>Tratamiento</b>	<b>N. ovocitos</b>	<b>Miv</b>	<b>Fiv</b>	<b>Civ</b>
Congelados	52	0.85	0.65	0.63
	45	0.89	0.62	0.62
	45	0.93	0.60	0.60
	40	0.85	0.48	0.48
	53	0.74	0.28	0.28
	50	0.66	0.50	0.50
	53	0.70	0.28	0.21
	50	0.70	0.50	0.50
	50	0.76	0.46	0.46
Vitrificados	51	0.80	0.67	0.67
	40	1.00	0.95	0.85
	35	0.94	0.63	0.63
	45	0.53	0.44	0.49
	60	0.77	0.62	0.52
	55	0.82	0.49	0.49
	53	0.66	0.49	0.49
	55	0.67	0.55	0.55
	57	0.74	0.58	0.58
Frescos	42	1.00	1.00	1.00
	46	1.00	1.00	0.85
	42	1.00	1.00	0.88
	41	1.00	0.83	0.83
	46	1.00	0.80	0.80
	49	1.00	0.82	0.82
	55	0.98	0.95	0.95
	57	0.96	0.88	0.88
	52	0.90	0.83	0.83

## A. CASO DE MADURACIÓN IN VITRO (MIV):

**Anexo 4.** Procesamiento estadístico. Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples (MIV)

### Prueba de normalidad:

Para la prueba de normalidad utilizamos el estadístico de Shapiro-Wilk para probar las hipótesis:

$H_0$ : Los residuos siguen la distribución normal

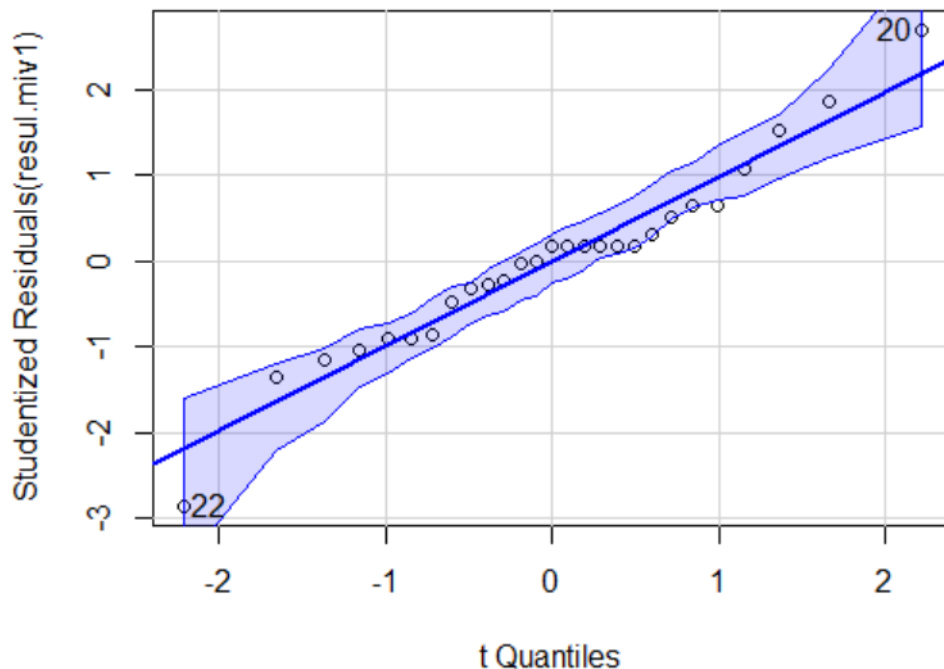
$H_a$ : Los residuos no siguen la distribución normal

Shapiro-Wilk normality test

data: resul. miv2\$res

W = 0.97067, p-value = 0.6195

Desde que el p-valor es  $0.6195 > 0.05$ , los residuos si se ajustan a la distribución normal. Este requisito de normalidad también es visualizado a través del gráfico qq-plot siguiente:



Para la prueba de homocedasticidad (homogeneidad de las varianzas), usamos la prueba de Levene, cuyo resultado se da a continuación, y donde se observa que este supuesto también es cumplido por los datos:

Levene's Test for Homogeneity of Variance

	Df	F value	Pr(>F)
Group	2	4.753	0.01824 *
	24		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

**Análisis de varianza:**

H<sub>0</sub>: Los porcentajes promedio de ovocitos, en cada tratamiento estudiado, considerando la maduración in vitro son iguales

H<sub>a</sub>: Los porcentajes promedio de ovocitos, en cada tratamiento estudiado, considerando la maduración in vitro son diferentes

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
Trat	2	0.25067	0.12534	12.122	0.0002298 ***
Residuals	24	0.24816	0.01034		

Hay una diferencia altamente significativa entre los porcentajes promedio de ovocitos de los tratamientos estudiados, considerando la maduración in vitro.

**Pruebas de comparaciones múltiples:**

1. Prueba de la mínima diferencia significativa (LSD):

least Significant Difference: 0.09893238

Treatments with the same letter are not significantly different.

	Miv	groups
Frescos	0.982222	a
Congelados	0.786667	b
Vitrificados	0.770000	b

Mediante las comparaciones múltiples encontramos que, como reportado en otros estudios, el tratamiento usado como control (frescos) es mejor en este caso, no habiendo diferencia significativa entre el método de congelados y vitrificados, que coincide con lo que ya habíamos encontrado a través de los contrastes ortogonales.

2. Prueba de Dunnett; Esta prueba es utilizada en investigaciones donde se considera el uso de un tratamiento usado como testigo.

Dunnett's test for comparing several treatments with a control: 95% confidence

level				
\$frescos	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval
Congelados-frescos	-0.1955556	-0.3081855	-0.08292558	0.00083 ***
Vitrificados-frescos	-0.2122222	-0.3248522	-0.09959224	0.00035 ***
---				
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

También a través de esta prueba se verifica lo que ya habíamos encontrado con las pruebas anteriores (contrastes ortogonales y mínima diferencia significativa), que al comparar con el testigo (frescos), ambos métodos (congelados y vitrificados) tienen un menor rendimiento.

## B. CASO DE FERTILIZACIÓN IN VITRO (FIV):

**Anexo 5.** Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples (FIV)

### Prueba de normalidad:

Para la prueba de normalidad utilizamos el estadístico de Shapiro-Wilk para probar las hipótesis:

$H_0$ : Los residuos siguen la distribución normal

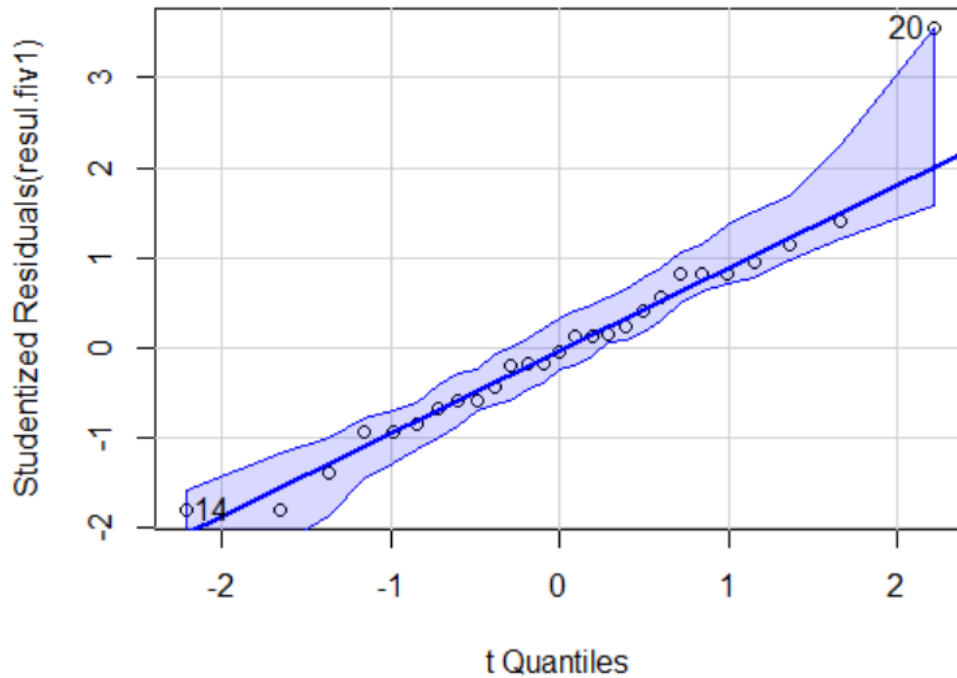
$H_a$ : Los residuos no siguen la distribución normal

Shapiro-Wilk normality test

data: resul. Fiv 2\$res

W = 0.96332, p-value = 0.4385

Como el p-valor es  $0.4385 > 0.05$ , los residuos se ajustan a la distribución normal. Este requisito de normalidad también es visualizado a través del gráfico qq-plot siguiente:



Para la prueba de homocedasticidad (homogeneidad de las varianzas), usamos la prueba de Levene, cuyo resultado se da a continuación, y donde se observa que este supuesto también es cumplido por los datos:

Levene's Test for Homogeneity of Variance

	Df	F value	Pr(>F)
Group	2	0.2443	0.7852
	24		

**Análisis de varianza:**

H<sub>0</sub>: Los porcentajes promedio de ovocitos, en cada tratamiento estudiado, considerando la fertilización in vitro son iguales

H<sub>a</sub>: Los porcentajes promedio de ovocitos, en cada tratamiento estudiado, considerando la fertilización in vitro son diferentes.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
Trat	2	0.82690	0.41345	25.823	1.04e-06 ***
Residuals	24	0.38427	0.01601		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Hay una diferencia altamente significativa entre los porcentajes promedio de ovocitos de los tratamientos estudiados, considerando la fertilización in vitro.

## Pruebas de comparaciones múltiples:

### 1. Prueba de la mínima diferencia significativa (LSD):

least Significant Difference: 0.1231099

Treatments with the same letter are not significantly different.

	FIV	groups
Frescos	0.9011111	a
Congelados	0.6022222	b
Vitrificados	0.4855556	b

Mediante las comparaciones múltiples encontramos que, como reportado en otros estudios, el tratamiento usado como control (frescos) es mejor en este caso, no habiendo diferencia significativa entre el método de congelados y vitrificados, que coincide con lo que ya habíamos encontrado a través de los contrastes ortogonales.

### 2. Prueba de Dunnett;

Dunnett's test for comparing several treatments with a control: 95% confidence level

\$frescos

	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval
Congelados-frescos	-0.4155556	-0.5557105	-0.2754006	6.6e-07 ***
Vitrificados-frescos	-0.2988889	-0.4390438	-0.1587340	7.9e-05 ***

---

Signif. Codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

A través de esta prueba se verifica lo que ya habíamos encontrado con las pruebas anteriores (contrastos ortogonales y mínima diferencia significativa), que al comparar con el testigo (frescos), ambos métodos (congelados y vitrificados) tienen un menor rendimiento.

## C. CASO DE CULTIVO IN VITRO (CIV):

**Anexo 6.** Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples (CIV)

### Prueba de normalidad:

Utilizamos el estadístico de Shapiro-Wilk para probar las hipótesis de normalidad de los datos:

$H_0$ : Los residuos siguen la distribución normal

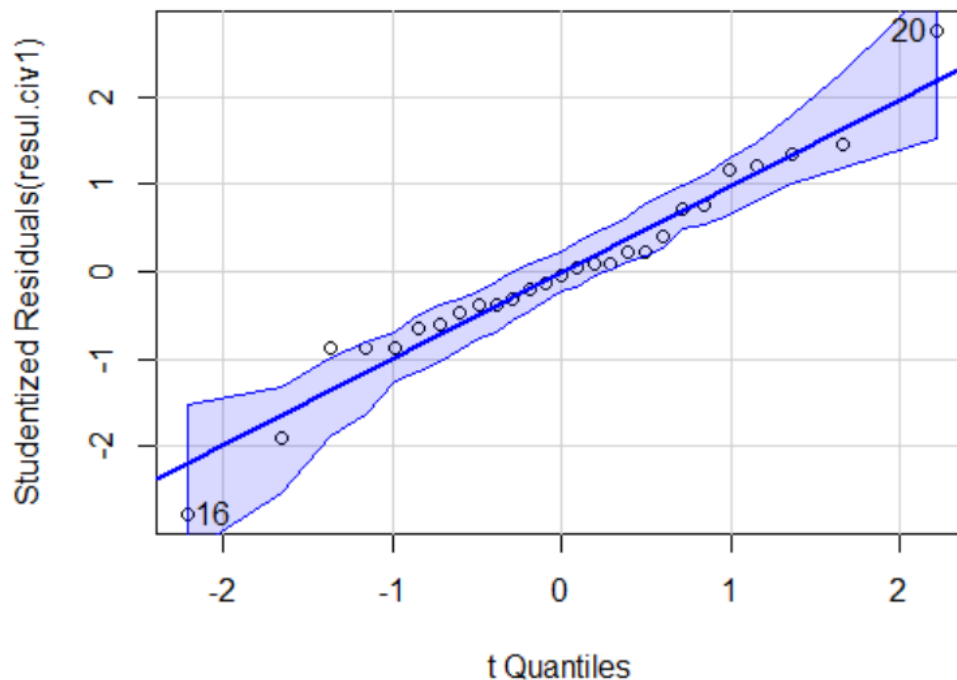
$H_a$ : Los residuos no siguen la distribución normal

Shapiro-Wilk normality test

data: resul. Civ 2\$res

W = 0.97434, p-value = 0.7187

Como el p-valor es  $0.7187 > 0.05$ , los residuos se ajustan a la distribución normal. Este requisito de normalidad también es visualizado a través del gráfico qq-plot siguiente:



Para la prueba de homocedasticidad (homogeneidad de las varianzas), usamos la prueba de Levene, cuyo resultado se da a continuación, y donde se observa que este supuesto también es cumplido por los datos:

Levene's Test for Homogeneity of Variance

	Df	F value	Pr(>F)
Group	2	1.0096	0.3793
	24		

**Análisis de varianza:**

H<sub>0</sub>: Los porcentajes promedio de ovocitos, en cada tratamiento estudiado, considerando el cultivo in vitro son iguales

H<sub>a</sub>: Los porcentajes promedio de ovocitos, en cada tratamiento estudiado, considerando el cultivo in vitro son diferentes

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
Trat	2	0.75032	0.37516	28.409	4.703e-07 ***
Residuals	24	0.31693	0.01321		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Hay una diferencia altamente significativa entre los porcentajes promedio de ovocitos de los tratamientos estudiados, considerando el cultivo in vitro.

**Pruebas de comparaciones múltiples:**

1. Prueba de la mínima diferencia significativa (LSD):

least Significant Difference: 0.1118048

Treatments with the same letter are not significantly different.

	CIV	groups
Frescos	0.8711111	a
Congelados	0.5855556	b
Vitrificados	0.4755556	b

Mediante las comparaciones múltiples encontramos que, como reportado en otros estudios, el tratamiento usado como control (frescos) es mejor en este caso, no habiendo diferencia significativa entre el método de congelados y vitrificados, que coincide con lo encontrado a través de los contrastes

ortogonales.

## 2. Prueba de Dunnett;

Dunnett's test for comparing several treatments with a control: 95% confidence level

\$frescos

	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval
Congelados-frescos	-0.3955556	-0.5228402	-0.2682709	3.0e-07 ***
Vitrificados-frescos	-0.2855556	-0.4128402	-0.1582709	4.1e-05 ***

---

Signif. Codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

A través de esta prueba se vuelve a verificar lo que ya habíamos encontrado con las pruebas anteriores (contrastos ortogonales y mínima diferencia significativa), que al comparar con el testigo (frescos), ambos métodos (congelados y vitrificados) tienen un menor rendimiento.

## D. TASA DE CLIVAJE AL TERCER DÍA (tc3d):

**Anexo 7.** Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples (**tc3d**)

### Prueba de normalidad:

Utilizando el estadístico de Shapiro-Wilk, probamos las hipótesis de normalidad de los datos transformados:

H<sub>0</sub>: Los residuos siguen la distribución normal

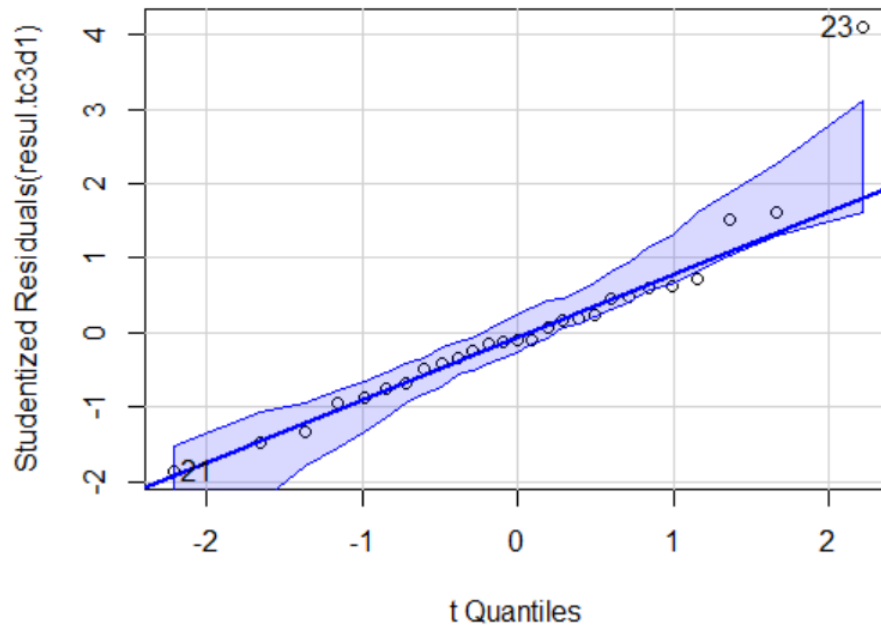
H<sub>a</sub>: Los residuos no siguen la distribución normal

Shapiro-Wilk normality test

data: resul.tc3d2\$res

W = 0.9359, p-value = 0.09652

Como el p-valor es  $0.09652 > 0.05$ , los residuos se ajustan a la distribución normal. Este requisito de normalidad también es visualizado a través del gráfico qq-plot siguiente:



Para la prueba de homocedasticidad (homogeneidad de las varianzas), usamos la prueba de Levene, cuyo resultado se da a continuación, y donde se observa que este supuesto también es cumplido por los datos transformados:

Levene's Test for Homogeneity of Variance

	Df	F value	Pr(>F)
Group	2	1.8197	0.1837
	24		

**Análisis de varianza:**

$H_0$ : Las tasas promedio de clivaje al tercer día, en cada tratamiento estudiado, considerando los datos transformados son iguales

$H_a$ : Las tasas promedio de clivaje al tercer día, en cada tratamiento estudiado, considerando los datos transformados son diferentes

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Trat	2	1924.7	962.33	14.985	5.979e-05 ***
Residuals	24	1541.2	64.22		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Hay una diferencia altamente significativa entre las tasas promedio de clivaje al tercer día, de los tratamientos estudiados, considerando los datos transformados.

### Pruebas de comparaciones múltiples:

#### 1. Prueba de la mínima diferencia significativa (LSD):

least Significant Difference: 7.796695

Treatments with the same letter are not significantly different.

	tc3d.trans	groups
Frescos	33.82264	a
Vitrificados	17.38051	b
Congelados	14.73793	b

Mediante las comparaciones múltiples encontramos que el tratamiento usado como control (frescos) es mejor en este caso, no habiendo diferencia significativa entre el método de congelados y vitrificados.

#### 2. Prueba de Dunnett;

Dunnett's test for comparing several treatments with a control: 95% confidence level

\$frescos

	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval
Congelados-frescos	-19.08471	-27.96089	-10.208535	7.1e-05 ***
Vitrificados-frescos	-16.44214	-25.31832	-7.565958	0.00042 ***

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

A través de esta prueba, se vuelve a verificar lo que ya habíamos encontrado con la prueba de mínima diferencia significativa, que al comparar con el testigo (frescos), ambos métodos (congelados y vitrificados) tienen un menor rendimiento.

## E. TASA DE CLIVAJE AL QUINTO DÍA (tc5d):

Anexo 8. Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples (tc5d)

### Prueba de normalidad:

Utilizando el estadístico de Shapiro-Wilk, probamos las hipótesis de normalidad de los datos transformados:

$H_0$ : Los residuos siguen la distribución normal

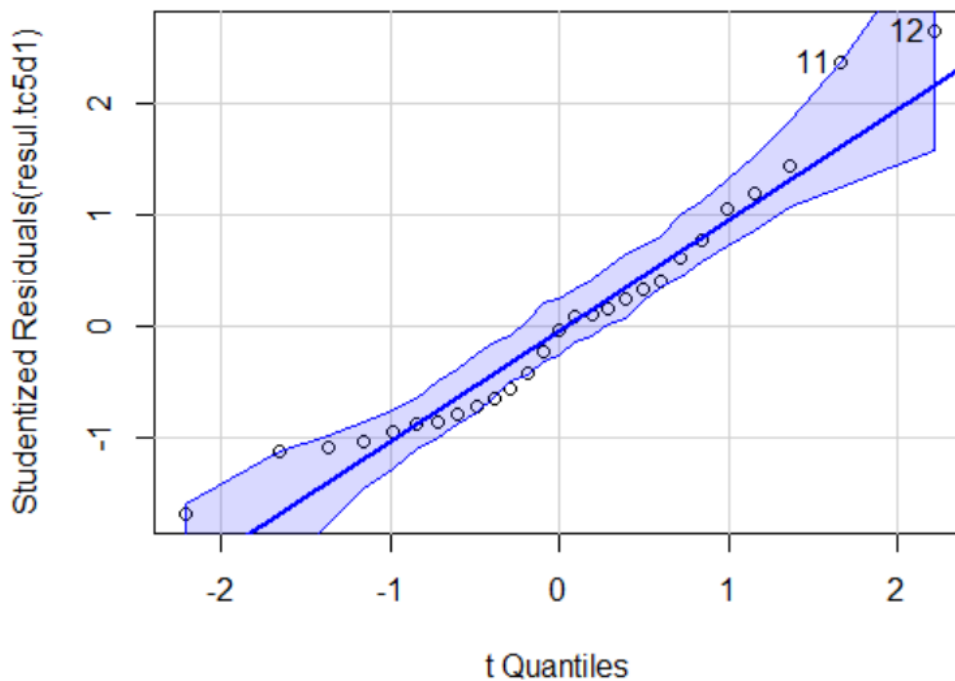
$H_a$ : Los residuos no siguen la distribución normal

Shapiro-Wilk normality test

data: resul.tc5d2\$res

W = 0.94418, p-value = 0.1545

Como el p-valor es  $0.1545 > 0.05$ , los residuos se ajustan a la distribución normal. Este requisito de normalidad también es visualizado a través del gráfico qq-plot siguiente:



Para la prueba de homocedasticidad (homogeneidad de las varianzas), usamos la prueba de Bartlett, cuyo resultado se da a continuación, y donde se observa que este supuesto también es cumplido por los datos transformados:

### Bartlett test of homogeneity of variances

data: tc5d.trans by trat

Bartlett's K-squared = 3.6017, df = 2, p-value = 0.1652

### Análisis de varianza:

H<sub>0</sub>: Las tasas promedio de clivaje al quinto día, en cada tratamiento estudiado, considerando los datos transformados son iguales.

H<sub>a</sub>: Las tasas promedio de clivaje al quinto día, en cada tratamiento estudiado, considerando los datos transformados son diferentes.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
Trat	2	1216.3	608.16	5.8342	0.008612 **
Residuals	24	2501.8	104.24		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Hay una diferencia altamente significativa entre las tasas promedio de clivaje al quinto día, de los tratamientos estudiados, considerando los datos transformados.

### Pruebas de comparaciones múltiples:

1. Prueba de la mínima diferencia significativa (LSD):

least Significant Difference: 9.933455

Treatments with the same letter are not significantly different.

	tc3d.trans	groups
Frescos	36.04784	a
Vitrificados	27.91327	ab
Congelados	19.60750	b

Mediante las comparaciones múltiples encontramos que el tratamiento usado como control (frescos) es mejor cuando es comparado con los congelados, pero no hay diferencia significativa respecto a los vitrificados; adicionalmente, los vitrificados tienen un mayor promedio respecto a los congelados, pero que no es suficiente para que exista diferencia significativa entre ellos.

## 2. Prueba de Dunnett;

Dunnett's test for comparing several treatments with a control: 95% confidence level

\$frescos

	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval
Congelados-frescos	-16.440341	-27.74912	-5.131558	0.0043 **
vitricados-frescos	-8.134567	-19.44335	3.174215	0.1801

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

A través de esta prueba, se vuelve a verificar lo que ya habíamos encontrado con la prueba de mínima diferencia significativa; al comparar con el testigo (frescos), hay diferencia altamente significativa respecto a los congelados, y no hay diferencia respecto a los vitrificados.

## F. TASA DE BLASTOCISTOS VIABLES (tbv):

**Anexo 9.** Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples (*tbv*)

### Prueba de normalidad:

Utilizando el estadístico de Shapiro-Wilk, probamos las hipótesis de normalidad de los datos transformados:

H<sub>0</sub>: Los residuos siguen la distribución normal

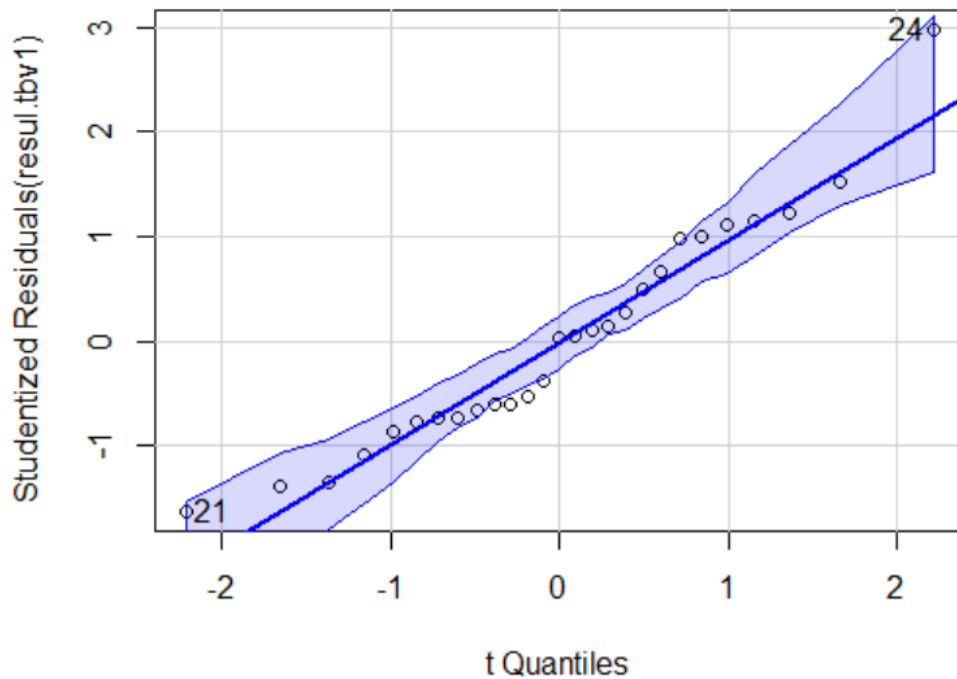
H<sub>a</sub>: Los residuos no siguen la distribución normal

Shapiro-Wilk normality test

data: resul.tbv2\$res

W = 0.95427, p-value = 0.2716

Como el p-valor es  $0.2716 > 0.05$ , los residuos se ajustan a la distribución normal. Este requisito de normalidad también es visualizado a través del gráfico qq-plot siguiente:



Para la prueba de homocedasticidad (homogeneidad de las varianzas), usamos la prueba de Bartlett, cuyo resultado se da a continuación, y donde se observa que este supuesto también es cumplido por los datos:

Bartlett test of homogeneity of variances

data: tbv by trat

Bartlett's K-squared = 2.6436, df = 2, p-value = 0.2667

**Análisis de varianza:**

H<sub>0</sub>: Las tasas promedio de blastocistos viables, en cada tratamiento estudiado, son iguales.

H<sub>a</sub>: Las tasas promedio de blastocistos viables, en cada tratamiento estudiado, son diferentes.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Trat	2	0.17403	0.087013	3.5568	0.04438 *
Residuals	24	0.58714	0.024464		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Hay diferencia significativa entre las tasas promedio de blastocistos viables, de los tratamientos estudiados.

### Pruebas de comparaciones múltiples:

F. Prueba de la mínima diferencia significativa (LSD):

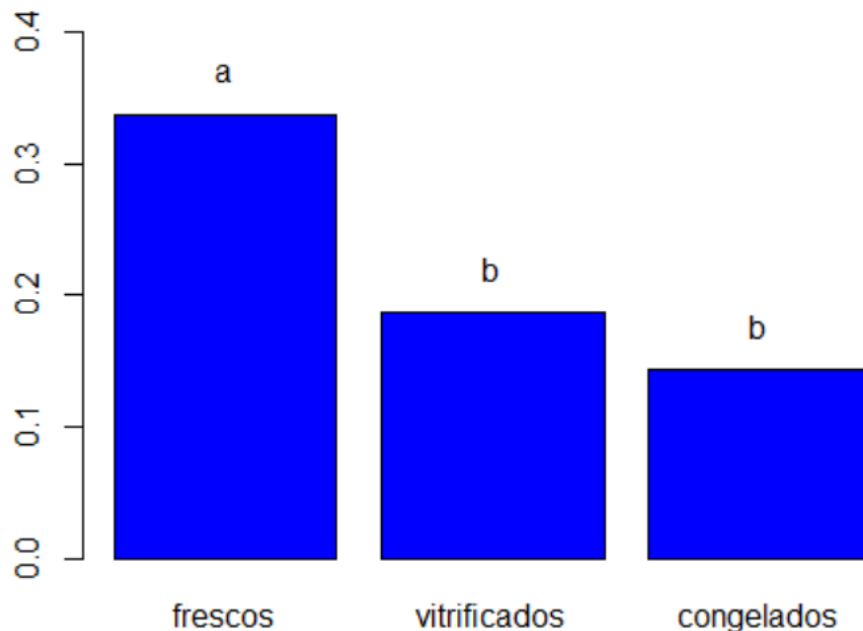
least Significant Difference: 0.1521759

Treatments with the same letter are not significantly different.

	tbv	groups
Frescos	0.3537362	a
Vitrificados	0.2017762	b
Congelados	0.1696572	b

Mediante las comparaciones múltiples encontramos que el tratamiento usado como control (frescos) es mejor cuando es comparado con los congelados, pero no hay diferencia significativa respecto a los vitrificados; adicionalmente, los vitrificados tienen un mayor promedio respecto a los congelados, pero no es suficiente para que exista diferencia significativa entre ellos.

#### Anexo 10. Prueba de la mínima diferencia significativa (*tbv*)



### G. Prueba de Dunnett;

Dunnett's test for comparing several treatments with a control: 95% confidence level

\$frescos	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval
Congelados-frescos	-0.184079	-0.3573242	-0.01083375	0.0365 *
Vitrificados-frescos	-0.151960	-0.3252053	0.02128524	0.0901 .

Signif. codes: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

A través de esta prueba, se vuelve a verificar lo que ya habíamos encontrado con la prueba de mínima diferencia significativa; al comparar con el testigo (frescos), hay diferencia significativa respecto a los congelados y los vitrificados.

#### H. CALIDAD DE BLASTOCISTOS (tcb):

**Anexo 11.** Prueba de normalidad, análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples (*tcb*)

##### Prueba de normalidad:

Utilizando el estadístico de Shapiro-Wilk, probamos las hipótesis de normalidad de los datos transformados:

H<sub>0</sub>: Los residuos siguen la distribución normal

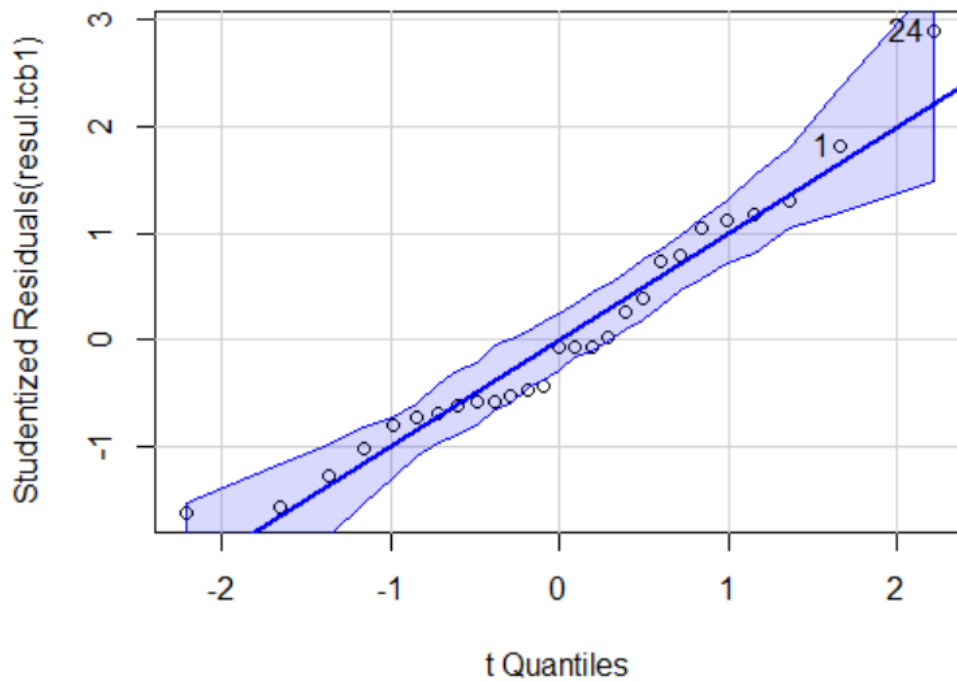
H<sub>a</sub>: Los residuos no siguen la distribución normal

Shapiro-Wilk normality test

data: resul.tcb2\$res

W = 0.95506, p-value = 0.2837

Como el p-valor es  $0.2837 > 0.05$ , los residuos se ajustan a la distribución normal. Este requisito de normalidad también es visualizado a través del gráfico qq-plot siguiente:



Para la prueba de homocedasticidad (homogeneidad de las varianzas), usamos la prueba de Bartlett, cuyo resultado se da a continuación, y donde se observa que este supuesto también es cumplido por los datos:

Bartlett test of homogeneity of variances

data: tcb by trat

Bartlett's K-squared = 2.8406, df = 2, p-value = 0.2416

**Análisis de varianza:**

H<sub>0</sub>: Las tasas promedio de calidad de blastocistos, en cada tratamiento estudiado, son iguales.

H<sub>a</sub>: Las tasas promedio de calidad de blastocistos, en cada tratamiento estudiado, son diferentes.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Trat	2	0.18530	0.092649	4.1215	0.02893 *
Residuals	24	0.53951	0.022480		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Hay diferencia significativa entre las tasas promedio de calidad de blastocistos, de los tratamientos estudiados.

**Pruebas de comparaciones múltiples:**

1. Prueba de la mínima diferencia significativa (LSD):

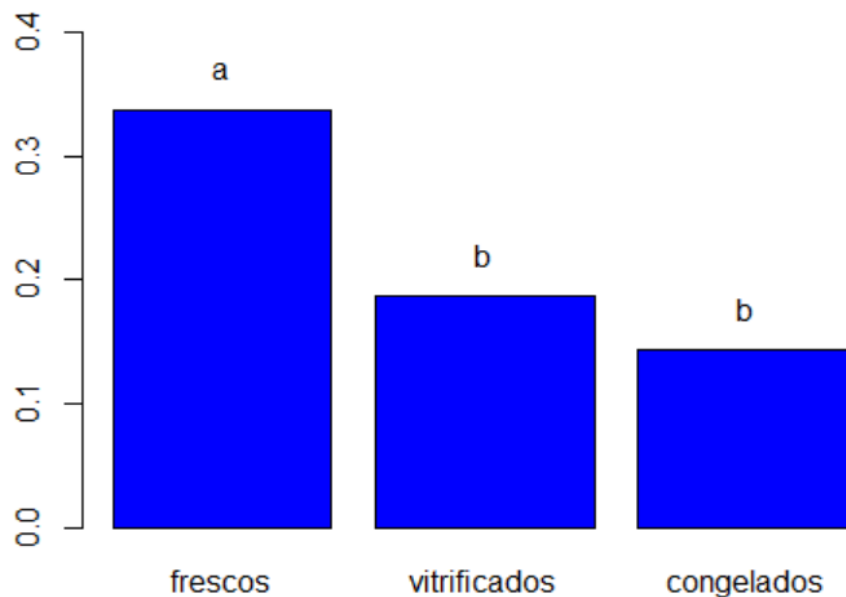
least Significant Difference: 0.1458733

Treatments with the same letter are not significantly different.

	TCB	groups
Frescos	0.3365124	a
Vitrificados	0.1865459	b
Congelados	0.1431412	b

Mediante las comparaciones múltiples encontramos que el tratamiento usado como control (frescos) es mejor en este caso, no habiendo diferencia significativa entre el método de congelados y vitrificados

**Anexo 12.** Prueba de la mínima diferencia significativa (*tcb*)



2. Prueba de Dunnett;

Dunnett's test for comparing several treatments with a control: 95% confidence level

\$frescos

	Diff	lwr.ci	upr.ci	pval
Congelados-frescos	-0.1933712	-0.3594412	-0.02730108	0.0215 *
Vitrificados-frescos	-0.1499665	-0.3160366	0.01610359	0.0798.

Signif. codes: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

A través de esta prueba, se verifica que al comparar con el testigo (frescos), hay diferencia significativa respecto a los congelados, y no hay diferencia respecto a los vitrificados.

### Anexo 13. Cálculo de eficacia de ovocitos vitrificados

AUTOR	Resultado alcanzado		Blastocisto viables (%)	Resultado Previsto (Prom Autores)	Eficacia=(Resultado alcanzado*100)/(Resultado previsto).
Zhou et al (2010)	0.18	100	18	20.546	0.88
Sprícigo et al (2011)	0.1923	100	19.23	20.546	0.94
Sprícigo et al. (2012)	0.349	100	34.9	20.546	1.70
Zhang et al. (2020)	0.076	100	7.6	20.546	0.37
Somfai et al. (2021)	0.23	100	23	20.546	1.12
	0.20546		20.546		1.03

### Anexo 14. Cálculo de eficacia de ovocitos congelados

AUTOR	Resultado alcanzado		blastocisto viable (%)	Resultado Previsto (Prom Autores)	Eficacia
Otoi 1995	0.009	100	0.9	0.9	1.00
					1.00

### Anexo 15. Cálculo de eficacia de los métodos de Criopreservación

Grupos	Resultado alcanzado		Blastocistos viables %	Resultado Previsto (Prom Autores)	Eficacia
Frescos	0.353736	100	35.37362	39.13	0.90
Congelados	0.169657	100	16.96572	90	0.19
Vitrificados	0.201776	100	20.17762	20.54	0.98

### Anexo 16. Panel fotográfico



Foto 1. Vaca criolla color negro



**Foto 2.** Vaca criolla color omara



**Foto 3.** Vaca criolla color pillco



**Foto 4.** Vaca criolla color josñe



**Foto 5.** Pase de vacas a través de manga de conducción a la ducha y al cajón de aturdimiento para el faenamiento



ESCUELA DE

**POSGRADO**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA

## **CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD N°0112-2025-UNSCH-EPG/OGH**

El que suscribe; responsable verificador de originalidad de trabajo de tesis de Posgrado en segunda instancia para la **Escuela de Posgrado – UNSCH**; en cumplimiento a la Resolución De Consejo Directivo N°109-2024-UNSCH-EPG/CD, Reglamento de Originalidad de trabajos de Investigación de la UNSCH, otorga lo siguiente:

### **CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD**

<b>AUTOR</b>	Bach. Lizbeth JANAMPA SERRANO
<b>DENOMINACIÓN DEL PROGRAMA DE ESTUDIOS</b>	MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
<b>GRADO ACADÉMICO QUE OTORGA</b>	MAESTRO
<b>DENOMINACIÓN DEL GRADO ACADÉMICO</b>	MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL
<b>TÍTULO DE TESIS</b>	Validar el efecto de dos métodos de crioconservación de ovocitos bovinos criollos sobre el desarrollo in vitro de embriones. Ayacucho a 2750 msnm - 2018
<b>EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD</b>	18% de similitud
<b>N° DE TRABAJO</b>	2784196345
<b>FECHA</b>	17 de octubre de 2025

Por tanto, según los artículos 12, 13 y 17 del Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación, es procedente otorgar la constancia de originalidad con depósito.

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que crea conveniente.

17 de octubre de 2025.

  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
ESCUELA DE POSGRADO  
**Dr. Oscar Gutiérrez Huamán**  
Director (e)

CC.  
Archivo  
OGH/rjcg

Validar el efecto de dos  
métodos de crioconservación  
de ovocitos bovinos criollos  
sobre el desarrollo in vitro de  
embriones. Ayacucho a 2750  
msnm-2018

*por* Lizbeth JANAMPA SERRANO

---

**Fecha de entrega:** 17-oct-2025 12:34p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2784196345

**Nombre del archivo:** TESIS\_LIZBETH\_POSGRADO\_FINAL\_octubre\_10\_absuelto.FINAL.docx (5.34M)

**Total de palabras:** 23763

**Total de caracteres:** 134240

# Validar el efecto de dos métodos de crioconservación de ovocitos bovinos criollos sobre el desarrollo in vitro de embriones. Ayacucho a 2750 msnm-2018

## INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

17%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://repositorio.unsch.edu.pe">repositorio.unsch.edu.pe</a> Fuente de Internet	4%
2	<a href="http://dspace.ucuenca.edu.ec">dspace.ucuenca.edu.ec</a> Fuente de Internet	2%
3	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1%
4	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	1%
5	<a href="http://1library.co">1library.co</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://dehesa.unex.es">dehesa.unex.es</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="http://repositorio.lamolina.edu.pe">repositorio.lamolina.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
8	<a href="http://scielo.sld.cu">scielo.sld.cu</a> Fuente de Internet	1%

---

9	Quispe Gutiérrez, Ulises Sandro. "Influencia de las hormonas folículo estimulante, luteinizante y gonadotropina coriónica equina en la maduración In vitro de ovocitos y clivaje de embriones de alpaca", Universidad Nacional del Altiplano de Puno (Peru) Publicación	1 %
10	<a href="http://bdigital.zamorano.edu">bdigital.zamorano.edu</a> Fuente de Internet	<1 %
11	<a href="http://cdigital.uv.mx">cdigital.uv.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
12	<a href="http://anatomaiyplastinacion.wikispaces.com">anatomaiyplastinacion.wikispaces.com</a> Fuente de Internet	<1 %
13	<a href="http://www.ridaa.unicen.edu.ar">www.ridaa.unicen.edu.ar</a> Fuente de Internet	<1 %
14	<a href="http://repositorio.utc.edu.ec">repositorio.utc.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
15	<a href="http://tesis.ucsm.edu.pe">tesis.ucsm.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
16	<a href="http://repository.ces.edu.co">repository.ces.edu.co</a> Fuente de Internet	<1 %
17	<a href="http://repositorio.udh.edu.pe">repositorio.udh.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %

---

18

"IETS 2010 abstracts", Reproduction Fertility and Development, 2010

Publicación

<1 %

19

Albarracín Monje, José Luis. "Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica Open Pulled Straw : estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro /", Bellaterra : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2005

Fuente de Internet

<1 %

20

Submitted to Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Trabajo del estudiante

<1 %

21

Submitted to Universidad Católica de Santa María

Trabajo del estudiante

<1 %

22

[repository.lasallista.edu.co](http://repository.lasallista.edu.co)

Fuente de Internet

<1 %

23

[www.scielo.org.mx](http://www.scielo.org.mx)

Fuente de Internet

<1 %

24

[www.uco.es](http://www.uco.es)

Fuente de Internet

<1 %

25

[caelum.ucv.ve](http://caelum.ucv.ve)

Fuente de Internet

<1 %

26 [docslide.us](http://docslide.us) Fuente de Internet <1 %

---

27 [www.redalyc.org](http://www.redalyc.org) Fuente de Internet <1 %

---

28 [repositorio.unjbg.edu.pe](http://repositorio.unjbg.edu.pe) Fuente de Internet <1 %

---

29 [www.samer.org.ar](http://www.samer.org.ar) Fuente de Internet <1 %

---

30 [doi.org](http://doi.org) Fuente de Internet <1 %

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR**  
**EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL**  
**RESOLUCIÓN DIRECTORAL N°00786-2025-UNSCH-EPG/D.**

Siendo las 04:00 p.m. del 24 de setiembre de 2025 se reunieron en el auditorium de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, el Jurado Examinador y Calificador de Tesis, presidido por el **Dr. OSCAR GUTIERREZ HUAMANI** Director (e) de la Escuela de Posgrado, el **Dr. RAUL JOSE PALOMINO MARCATOMA** Director de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias, e integrado por los siguientes miembros: **Dr. FELIPE ESCOBAR RAMIREZ** y la **Mtra. GLORIA BETTI ADRIANZEN FACUNDO**; para la sustentación oral y pública de la tesis titulada: **VALIDAR EL EFECTO DE DOS MÉTODOS DE CRIOCONSERVACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS CRIOLLOS SOBRE EL DESARROLLO IN VITRO DE EMBRIONES. AYACUCHO A 2750 MSNM - 2018**, presentado por la **Bach. LIZBETH JANAMPA SERRANO**. Teniendo como asesor al **Dr. LUIS ARTURO RODRIGUEZ ZAMORA**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar el Grado Académico de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación, el Jurado Examinador y Calificador de Tesis procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo: DIÉCISEIS ( 16 ).

**CALIFICACION (x)**

Aprobado(a) por Unanimidad.	<input checked="" type="checkbox"/>
Aprobado(a) por Mayoría.	<input type="checkbox"/>
Desaprobado(a) por Unanimidad.	<input type="checkbox"/>
Desaprobado(a) por Mayoría.	<input type="checkbox"/>

(x) Marcar con aspa.

Luego, el presidente del Jurado recomienda que la Escuela de Posgrado proponga que se le otorgue a la **Bach. LIZBETH JANAMPA SERRANO**, el Grado Académico de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL**. Siendo las 5:40 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en la ciudad de Ayacucho, a las 5:40 hrs. del 24 de setiembre de 2025.

  
.....  
**Dr. OSCAR GUTIERREZ HUAMANI**  
Director(e) de la Escuela de Posgrado.

  
.....  
**Dr. RAUL JOSE PALOMINO MARCATOMA**  
Director de la UPG-FCA

  
.....  
**Dr. FELIPE ESCOBAR RAMIREZ**  
Miembro.

  
.....  
**Mtra. GLORIA BETTI ADRIANZEN FACUNDO**  
Miembro.

  
.....  
**Dr. JOSE ALARCON GUERRERO**  
Secretario Docente.

**Observaciones:**

.....  
.....  
.....