

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE OBTENCIÓN
DE OVOCITOS SOBRE LA TASA DE MADURACIÓN
NUCLEAR IN VITRO DE OVOCITOS
DE PORCINOS”

TESIS

Presentada por

Bach. Sujey Margot Gutierrez Mayta

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

TACNA – PERÚ

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TESIS

“COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE OBTENCIÓN
DE OVOCITOS SOBRE LA TASA DE MADURACIÓN
NUCLEAR IN VITRO DE OVOCITOS
DE PORCINOS”

Tesis sustentada y aprobada el 20 de noviembre de 2023, siendo el jurado calificador:

PRESIDENTE:



.....
Msc. Cesario Sebastián Cruz Anchapuri

SECRETARIO:



.....
Msc. Emilio Maquera Llano

VOCAL:



.....
Msc. Duany Condemayta Cutipa

ASESOR:



.....
Dr. Daniel Gandarillas Espezúa

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Daniel Gardarillas Espezúa en mi condición de asesor acreditado por la Resolución de Facultad N° 6912-2022-FCAG de la tesis Titulada:

“EVALUACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE OBSTENCIÓN DE OVOCITOS SOBRE LA TASA DE MADURACIÓN NUCLEAR IN VITRO DE OVOCITOS DE PORCINOS” , Presentado por la Bach. Sujey Margot Gutierrez Mayta. Para optar el Título profesional de Médico Veterinario y Zootecnista.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajo de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del **software de similitud textual** turnitin cuenta con el nivel de **similitud permitido cuyo porcentaje** es 1% Por lo que, **CERTIFICO LA SIMILARIDAD** de la tesis enunciado líneas arriba, la cual esta expedita para continuar con los trámites para la obtención de Título profesional, según corresponda consiguientemente la publicación en el repositorio institucional.



Dr. Daniel Gardarillas Espezúa

DNI: 01771233



Bach. Sujey Margot Gutierrez Mayta

DNI: 72032976



DEDICATORIA

A Dios, por darme vida, salud, sabiduría, fortaleza para poder culminar mis estudios y enfrentar cada día de mi vida.

A mis padres Alejandro Gutiérrez y María Mayta por su amor, comprensión y por el apoyo que me brindaron en toda mi carrera universitaria hasta el día de hoy.

A la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por darme la oportunidad de seguir una carrera profesional.

AGRADECIMIENTO

A mi alma mater la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por brindarme su calurosa estadía durante el trascurso de mi vida universitaria.

A mi asesor el Dr. Daniel Gandarillas Espezúa por sus enseñanzas, guiarme y brindarme su apoyo para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Proyecto de investigación “Uso de biotecnología para el mejoramiento genético y desarrollo de capacidades en el manejo de alpacas en la zona alto andina de Tacna” por brindarme su apoyo para el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.1 Descripción del Problema.....	4
1.2 Justificación.....	6
1.3 Objetivo General.....	10
1.3.1 Objetivos Específicos.....	10
1.4 Hipótesis de investigación	10
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	11
2.1 Antecedentes	11
2.2 <i>Bases Teóricas</i>	14
2.2.1 Anatomía y fisiología del ovario de la marrana.....	14
2.2.2 Ovogénesis.....	15
2.2.3 Foliculogénesis	16

2.2.4	Maduración del ovocito	17
2.2.5	Ovulación	19
2.2.6	Recolección y transporte de ovarios	19
2.2.7	Clasificación de ovocitos	21
2.2.8	Maduración in vitro de ovocitos porcinos	22
2.2.9	Medios de maduración in vitro	23
2.3	Marco conceptual	24
CAPÍTULO III MATERIAL Y MÉTODOS		26
3.1	Ubicación Geográfica y Temporal	26
3.2	Materiales	26
3.2.1	Equipos de laboratorio	26
3.2.2	Material de laboratorio	27
3.2.3	Reactivos e insumos químicos	28
3.3	Diseño experimental	29
3.4	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	29
3.4.1	Técnica de recolección de datos	29
3.5	Análisis estadístico	32
CAPÍTULO IV RESULTADOS		34
4.1	Número de ovocitos recuperados según técnica de aspiración folicular y corte	34

4.2	Calidad de ovocitos recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte	37
4.3	Tasa de maduración <i>in vitro</i> según la técnica de aspiración folicular y corte.	40
CAPÍTULO V DISCUSIÓN.....		49
5.1	Número de ovocitos recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte	49
5.2	Calidad de ovocitos recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte	50
5.3	Tasa de maduración <i>in vitro</i> según la técnica de aspiración folicular y corte.	51
CONCLUSIONES		53
RECOMENDACIONES.....		54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		55
ANEXOS.....		67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recuperación de COCs por la técnica de aspiración folicular. ..	34
Tabla 2. Recuperación de COCs por la técnica de corte.	35
Tabla 3. Número de ovocitos recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte	36
Tabla 4. Calidad de COCs recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte	39
Tabla 5. Tasa de maduración nuclear in vitro de ovocitos según la técnica de aspiración folicular y corte	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Grafica de cajas para el número de COCs recuperados según técnica de aspiración folicular y corte.....	37
Figura 2. Calidad de COCs según técnica de aspiración folicular y corte (n).	39
Figura 3. Grafica de cajas para COCs seleccionados para MIV según técnica de recuperación.....	41
Figura 4. Frecuencia absoluta de estadio de maduración de ovocitos según técnica de recuperación.....	43
Figura 5. Frecuencia relativa (%) de estadio de maduración de ovocitos según técnica de recuperación.....	44

RESUMEN

El trabajo se realizó con el objetivo de comparar dos técnicas de recuperación de ovocitos sobre la tasa de maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de porcinos. Para lo cual se colectaron 68 ovarios de animales beneficiados en el Camal Municipal de Tacna y fueron distribuidos en dos tratamientos: T1 (Técnica Aspiración) = 34 ovarios y T2 (Técnica de corte) = 34 ovarios. Se determinó el número de complejos cúmulus ovocitos (COCs) recuperados, la calidad de COCs y tasa de maduración *in vitro*, para ambas técnicas. La clasificación de COCs se realizó de acuerdo a las células del cúmulus y apariencia citoplasmática y la maduración *in vitro* se realizó en medio TCM-199, incubados a 38°C con 5% de CO₂ por un período de 48 horas. Culminado el tiempo de maduración, los ovocitos fueron fijados en solución etanol: ácido acético (3:1) y teñidos con aceto-orceína (1%) para determinar el estadio de maduración. El promedio de ovocitos recuperados no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$), siendo para la técnica de aspiración folicular 8,09 COCs/ovario y por corte 14,50 COCs/ovario. De la misma manera, en calidad de COCS no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$). En la maduración *in vitro* se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos, siendo para aspiración de 29,93% de ovocitos

en metafase II y 22,07% para corte. En conclusión, con la técnica de aspiración folicular se logran obtener ovocitos de buena calidad y competentes para la maduración *in vitro*.

Palabras clave: *Selección de ovocitos, aspiración folicular, slicing,, Sus scrofa domesticus.*

ABSTRACT

The present work was carried out with the objective of comparing two oocyte recovery techniques on the in vitro nuclear maturation rate of porcine oocytes. For which 68 ovaries were collected from beneficiary animals in the Tacna Municipal Camal and were distributed in two treatments: T1 (Aspiration Technique) = 34 ovaries and T2 (Cutting Technique) = 34 ovaries. The number of cumulus oocyte complexes (COCs) recovered, the quality of COCs and the in vitro maturation rate are calculated for both techniques. The classification of COCs was carried out according to cumulus cells and cytoplasmic appearance and in vitro maturation was carried out in TCM-199 medium, incubated at 38°C with 5% CO₂ for a period of 48 hours. At the end of the maturation time, the oocytes were fixed in ethanol:acetic acid solution (3:1) and stained with aceto-orcein (1%) to determine the maturation stage. The average number of oocytes recovered did not show significant differences between treatments ($P>0,05$), being 8,09 COCs/ovary for the follicular aspiration technique and 14,50 COCs/ovary for cutting. Likewise, in terms of COCS, no significant differences were shown between treatments ($P>0,05$). In in vitro maturation, significant differences ($p<0,05$) were found between treatments, with 29,93% of oocytes in metaphase II for aspiration and 22,07% for cutting. In

conclusion, with the follicular aspiration technique it is possible to obtain oocytes of good quality and competent for in vitro maturation.

Keywords: *Oocyte selection, follicular aspiration, slicing, Sus scrofa domestica.*

INTRODUCCIÓN

Se presume que la población mundial para el 2 050 aumente 9 800 millones, y se espera que el consumo per cápita en el consumo de carne y leche aumente en un 20% (Alexandratos & Bruinsma, 2003). Por otro lado, la producción ganadera contribuye significativamente al calentamiento global (FAO, 2021). Resolver estos problemas significa que se necesita producir más carne con menos animales y en menos tiempo. Esto podría generar una demanda insostenible, tanto para el medio ambiente como para los productores de alimentos sin suficiente innovación (Fowler et al., 2018). La producción de porcinos representa aproximadamente el 40% del consumo mundial de carne (Tilman et al., 2002), por lo que requiere una mayor productividad a través de una selección rápida para una mayor eficiencia de conversión alimenticia, una mejor resistencia a enfermedades y un mejor bienestar animal (Fowler et al., 2018).

La producción de embriones *in vitro* (PIVE) es una opción atractiva para multiplicar animales genéticamente superiores (Chen et al., 2021), ya que esta técnica nos permite utilizar una mayor parte de su reserva ovárica de ovocitos inmaduros, lo que reduce el desperdicio reproductivo, además los ovocitos podrían recuperarse post mortem de hembras valiosas y

someterse a PIVE con el propósito de rescate genético. También podría lograrse un aumento en la tasa de ganancia genética aplicando esta tecnología a ovocitos inmaduros recuperados de hembras jóvenes, lo que reduciría significativamente el intervalo generacional (Gruppen, 2014).

Sin embargo, los éxitos alcanzados en la eficiencia de la producción de embriones porcinos *in vitro* sigue siendo baja, especialmente en comparación con el ganado vacuno y ovino (Gruppen, 2014; Chen et al., 2021). Esto requiere explorar cuidadosamente el proceso completo de la PIVE; desde la recolección de ovocitos, maduración, fertilización, cultivo, hasta su transferencia de embriones o la conservación (Fowler et al., 2018).

La recolección de ovocitos es el primer paso a considerar, ya que su inadecuado procedimiento conlleva con la recuperación de un menor número de ovocitos y de baja calidad, puesto que en estudios previos se ha descrito una asociación positiva entre la calidad del ovocito y la capacidad de éste para completar la meiosis y sufrir eventos de fertilización (Gruppen, 2014).

Existen escasos estudios que realicen la comparación de técnicas de recolección de ovocitos sobre el desarrollo embrionario *in vitro*, los existentes muestran resultados variables (Benavides et al., 2015; Rodríguez, 2013; Lorenzo et al., 2015). En ese contexto, el objetivo del

proyecto de investigación es comparar dos técnicas de obtención de ovocitos sobre la tasa de maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de porcinos, con la finalidad de contribuir en la aplicabilidad de la producción de embriones *in vitro*.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del Problema

Durante muchos años, la producción de embriones *in vitro* de porcinos ha sido objeto de estudio de múltiples investigaciones, y si bien actualmente varios grupos de investigadores están trabajando en esta técnica, la tasa de éxito sigue siendo baja, especialmente en comparación con otras especies (Funahashi & Day, 1997), porque el desarrollo es menos del tercio de los embriones resultantes de la maduración *in vitro*.

Existen factores que influyen en el éxito de la producción de embriones *in vitro*, de los cuales aún son desconocidos o no han sido bien esclarecidos (Benavides et al., 2015). Es por ello, que la disponibilidad de un número suficiente de ovocitos es el requisito previo para el procedimiento de producción de embriones *in vitro* (Garcia, 2015).

En tal sentido, la obtención de ovarios provenientes de animales beneficiados en el camal es una fuente importante de complejo cúmulus ovocitos (COCs) y a un menor costo, lo cual posibilita para la estandarización de protocolos de maduración, fertilización y cultivo *in vitro*

(Ruíz, 2013). Existen diversas técnicas para la recuperación de los COCs, los más utilizados son la aspiración folicular y corte (Slicing), donde la aspiración folicular consiste en realizar punción en los folículos antrales mayores a 3 mm y luego ejercer una presión negativa para aspirar el contenido folicular, durante este proceso se puede perder la calidad de los COCs debido al desprendimiento de las células del cúmulus y la cantidad de COCs recuperados suele ser menor con respecto a otras técnicas (Coy y Romar, 2002). Por otro lado, la técnica de corte consiste en realizar varios cortes a nivel de la corteza del ovario; la recuperación de COCs es mayor, sin embargo, esta técnica consume más tiempo, los COCs obtenidos pueden ser heterogéneos y la posibilidad de contaminación es alta (Lorenzo et al., 2015).

En estudios realizados en la especie bovina por Benavides et al. (2015), determinaron que los ovocitos recuperados por la técnica aspiración folicular mostraron una mayor tasa de desarrollo embrionario *in vitro* que los ovocitos recuperados por la técnica de corte. Por otro lado, Rodríguez (2013) menciona que la técnica de corte es la más eficiente con respecto a la aspiración folicular, reportando mayor porcentaje en la recuperación y calidad de los COCs.

En la especie porcina, Fernández et al. (2010) reportó que las dos técnicas no influyen sobre la tasa de recuperación de COCs ni en el desarrollo embrionario *in vitro*. Sin embargo, Lorenzo *et al.* (2015) reporta que se obtiene mayor número de COCs por corte; pero, con respecto a la calidad no hubo diferencias, sin embargo, en la maduración nuclear *in vitro* la técnica de aspiración folicular presentó mayor tasa de ovocitos maduros (57,3%) respecto al corte (33,3%).

La calidad de los COCs está relacionada con la competencia de desarrollo embrionario; ya que la presencia de varias capas de células del cúmulus favorece la maduración ovocitaria. Es por ello, que en diversos trabajos de investigación encontraron una asociación positiva entre las características morfológicas y la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro* (Gruppen, 2014). Hasta el momento las diferentes técnicas que se utilizan para la recuperación de COCs han presentado resultados variables

1.2 Justificación

La producción de porcinos en el país muestra un crecimiento sostenido a través de los años, más del 47,1% de crecimiento desde el 2011 al 2019. Según la estimación de la Asociación Peruana de Porcicultores, hay más de 600 mil productores de carne de cerdo en el Perú. De los cuáles, el 76% pertenecen al segmento rural o de consumo

propio y producen cerca de 48 000 TM de carne de cerdo (20% de la producción anual) (Carrasco, 2021; INEI, 2021).

En la región de Tacna, la población de cerdos bordea los 102 mil animales, con una producción de 2 827 TM anuales (INEI, 2021; SENASA, 2021). Existen aproximadamente 2 125 unidades productivas en la periferia de la ciudad de Tacna (Mamani, 2013). La productividad que logran es de 20 a 24 lechones/cerda/año, la alimentación es realizada con restos de comida más concentrados (53,2%), su comercialización se destina al comercio local principalmente (59,1%) (Mamani, 2013).

Actualmente para la formación de granjas núcleo con animales de alto valor genético en nuestro país, la única opción es la importación de animales vivos de casas genéticas extranjeras, permitiendo el ingreso de enfermedades, como: Síndrome Reproductivo Respiratorio Porcino (PRRS), Circovirus Porcino, Gastroenteritis Transmisibles (GET), Diarrea Epidémica Porcina (PED), Mycoplasma sp, entre otros. Estas enfermedades generan grandes pérdidas económicas para los poricultores, debido a que ocasionan elevadas mortalidades y una menor productividad (Carrasco, 2021).

En porcinos, se han venido aplicando técnicas avanzadas en biotecnologías reproductivas (Marinome et al., 2018), donde la producción

de embriones *in vitro* en porcinos mejoraría considerablemente la aplicabilidad de estas biotecnologías. Además, el uso de embriones producidos *in vitro* facilitaría el transporte global de poblaciones genéticamente superiores de una manera que brindaría un mayor bienestar animal, un menor costo y una mayor bioseguridad.

La producción de embriones *in vitro* tiene cuatro fases. La primera es la recuperación y obtención de ovocitos; la segunda maduración de ovocitos; la tercera la fecundación de los ovocitos; y el último cultivo embrionario (Castillo, 2020). Pero, existen muchos factores que afecten la producción de embriones en porcino, tales como la técnica de recolección de ovocitos, una incorrecta maduración citoplasmática del ovocito (Mattioli et al., 1991) y la alta incidencia de polispermia, lo que ocasiona un bajo potencial de desarrollo después de la fecundación (Hunter, 2000).

La recuperación de ovocitos es el primer paso fundamental para establecer programas de fertilización *in vitro*. Actualmente existen diversos métodos para la obtención de complejos cúmulus ovocitos (COCs) a partir de folículos del ovario, como son: aspiración folicular y corte de los folículos, cada una de estas técnicas presentan ventajas y desventajas (Özturkler, 2002; Abeydeera, 2002). El principal factor a considerar en esta etapa, es el tamaño de folículos de los cuales se van a extraer, sin que éstos tengan

efectos negativos sobre la calidad de los ovocitos y que éstos sean competentes para tener una óptima maduración *in vitro*.

En porcinos existen pocos reportes sobre la relación de técnicas de recuperación de COCs con la maduración de los ovocitos y se desconoce la capacidad meiótica de los COCs recuperados. La mayoría de los trabajos realizados en porcinos fue determinar la tasa de recuperación y calidad de los COCs sin relacionar la competencia de la maduración del ovocito. Por otro lado, la calidad del ovocito es definida como la competencia de alcanzar hasta el estadio de blastocisto dentro de un sistema de producción *in vitro* de embriones (Merton et al., 2003).

Por consiguiente, existe la necesidad de profundizar en la primera etapa de la producción de embriones *in vitro* en la especie porcina, para determinar cuál es la técnica adecuada para la recuperación de COCs, favoreciendo su calidad, número y su competencia en la maduración nuclear *in vitro*.

1.3 Objetivo General

Comparar dos técnicas de recuperación de ovocitos sobre la tasa de maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de porcinos.

1.3.1 Objetivos Específicos

- Determinar el número de ovocitos recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte.
- Evaluar la calidad de ovocitos recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte.
- Determinar la tasa de maduración *in vitro* según la técnica de aspiración folicular y corte.

1.4 Hipótesis de investigación

La recuperación de ovocitos, calidad y la tasa de maduración nuclear *in vitro* es diferente entre la técnica de aspiración folicular y corte.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Fernández *et al.* (2007) realizaron la investigación en *maduración y fertilización in vitro de ovocitos de cerda obtenidos por aspiración y corte de folículos*. A través de su estudio comparan las dos técnicas de recuperación de ovocitos en ovarios obtenidos de animales beneficiados, los complejos cumulo ovocitos recuperados de buena calidad, lo sometieron a maduración y fertilización *in vitro*. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en la maduración nuclear y en la fertilización *in vitro* entre las dos técnicas de recuperación de ovocitos. Por lo tanto, las dos técnicas no influyen sobre la maduración y el desarrollo embrionario *in vitro* en porcinos.

De igual manera Lorenzo *et al.* (2015) en la investigación *Comparación de dos técnicas para la obtención de complejos cúmulos ovocito (COCs) porcino*, buscaron conocer cuál de las dos técnicas es favorable en la recuperación, calidad de los COCs y capacidad de maduración nuclear. A través de esta investigación reportan que con el método de corte se obtiene mayor número de COCs, pero, con respecto a

la calidad en ambas técnicas se obtuvieron similares resultados. En la maduración nuclear los COCs recuperados por aspiración, mostraron mejores resultados.

Por su parte Vasquez et al. (2015) realizaron la investigación *Efecto de dos métodos de colección sobre la cantidad y calidad ovocitaria de alpacas y llamas post mortem*. Cuyo objetivo se basó en experimentar con cuál de las dos técnicas se recuperan mayor número y mejor calidad de COCs en llamas y alpacas. Los resultados mostraron que el número y la calidad COCs fue superior por el método de corte que, con el método de aspiración folicular, tanto en alpacas como en llamas.

En la investigación realizada por Rodríguez (2013) titulada *Optimización del método de recuperación de ovocitos para la fecundación in vitro*, se centró en determinar la eficiencia en la obtención de ovocitos por los métodos de aspiración y corte partir de ovarios procedentes de hembras bovinas de aptitud cárnica y lechera sacrificadas en matadero. Los resultados obtenidos dieron que con el método de corte se obtienen mayor número y calidad de COCs en hembras bovinas de aptitud cárnica y lechera.

En la investigación realizada por Abdoon et al. (2014) en equinos recuperaron utilizando con agujas de 18 G, 20 G y probando dos técnicas de corte y aspiración de folículos ováricos para determinar el número y la morfología de los COCs recuperados. Donde los resultados obtenidos mencionan que con la técnica de corte y aspiración con una aguja de 18 G se obtuvieron mayor porcentaje de ovocitos de grado A

Por su parte Anguita et al. (2009) evaluaron en cabras pre púberes la apoptosis en ovocitos y células del cumulo, evaluada mediante tinción con anexina V y ensayo TUNEL separando grupos de ovarios según el tamaño de los folículos, de los cuales recuperaron los COCs por la técnica de aspiración. Donde, mencionan que el diámetro de los ovocitos y la morfología de los COCs no tuvieron efecto sobre el porcentaje de apoptosis en las células de blastocisto.

De igual manera Benavides et al. (2015) investigaron el efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno sobre el Desarrollo de Ovocitos Bovinos Fecundados y Cultivados in vitro. Donde, obtuvieron mejores tasas de maduración y desarrollo embrionario cuando los COCs fueron recuperados por la técnica de aspiración y son cultivados a una baja tensión de oxígeno

Por su parte Majeed et al. (2011) investigaron en cabras para conocer el efecto de las técnicas de recolección en la recuperación y sobre la maduración in vitro. Donde. Reportan una tasa de recuperación de 76,94% por aspiración y por corte 69,93% y de igual manera se obtuvo un mayor porcentaje de maduración in vitro con los COCs obtenidos por aspiración.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Anatomía y fisiología del ovario de la marrana

El ovario de la marrana se encuentra ubicado en la cavidad abdominal. Realiza funciones endocrinas y exocrinas. La forma del ovario se asemeja a un racimo de uvas debido a que los folículos sobresalen y los cuerpos lúteos oscurecen el tejido ovárico subyacente (Hafez & Hafez, 2002)

El ovario está constituido por médula y corteza; la médula consiste en tejido conectivo fibroelástico y sistemas de vasos sanguíneos y nervioso, en cambio la corteza ovárica contiene folículos ováricos, cuerpos lúteos o ambos en diferentes estadios o en regresión (Galina, 2008)

2.2.2 Ovogénesis

Es el proceso desde que una célula diploide ($2n$) se produce una célula funcional (el ovocito (n)), y tres células no funcionales (los cuerpos polares (n)) (Albarracín, 2005).

Se destacan tres procesos importantes que son: reclutamiento, selección y dominancia (Azada, 2008)

- a) **Reclutamiento.** Es el proceso por el que, bajo la responsabilidad de la hormona folículo estimulante (FSH), un conjunto de folículos antrales tempranos, comienzan a crecer en un medio con suficiente soporte gonadotrófico que les permita progresar a la ovulación. (Hafez & Hafez, 2002).
- b) **Selección.** Es el proceso por el cual un folículo evita la atresia con la posibilidad de llegar a la ovulación (Albarran & Calderon, 2007).
- c) **Dominancia.** El folículo ovárico escapa de la atresia y empieza con la secreción de Inhibina y estrógenos, los cuales producen la inhibición del reclutamiento de una nueva onda folicular. Cuando los niveles de P4 son bajos, el folículo dominante tiene la capacidad de ovular y consecuente formación de cuerpo lúteo (Manjarrés, 2015). En caso contrario cuando el folículo dominante llega a la fase de dominancia durante la fase lútea, en la cual existen altos niveles de

P4, cuando los niveles de la hormona luteinizante (LH) no son suficientes para promover su crecimiento final y ovulación, este folículo dominante pierde su dominancia y permite el reclutamiento y la emergencia de una nueva cohorte de folículos del cual saldrá el próximo folículo dominante (Hafez & Hafez, 2002; Galina, 2008).

2.2.3 Foliculogénesis

Es la formación y maduración del folículo primordial hasta períodos intermedios o finales. De acuerdo a la etapa de desarrollo, se distinguen distintos tipos de folículos (Espinoza, 2009).

El folículo primordial se transforma en folículo primario, que se caracteriza por la presencia una capa unilaminar de células granulosas cuboides alrededor del ovocito. En el folículo primario se produce un aumento del volumen del ovocito, sin división celular del mismo (permanece en una profase meiótica), y una hiperplasia e hipertrofia de las células de la granulosa, formación de la zona pelúcida, diferenciación de las células de la teca, dando lugar al folículo secundario, este folículo posee varias capas de células de la granulosa que encierran a un ovocito secundario (Hafez & Hafez, 2002). Seguido a esto se forman los folículos terciarios, constituidos por varias capas de células granulosas que van formando un antro (antrum) que se llena de líquido (Albarracín, 2005). El folículo terciario

contiene a un ovocito secundario latente en la profase de la mitosis I, que se prepara para ser expulsado hacia la trompa de Falopio (Hafez & Hafez, 2002).

Las uniones celulares entre las células foliculares y el ovocito son responsables de la maduración coordinada del folículo y del ovocito (Hafez & Hafez, 2002).

2.2.4 Maduración del ovocito

La maduración del ovocito, comprende dos etapas: un período de crecimiento y un período final de preparación nuclear y citoplasmática; maduración nuclear y citoplasmática, hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente (Hafez & Hafez, 2002).

El crecimiento del ovocito se da en paralelo con la foliculogénesis. Para este proceso las células internas del *cúmulus* cooperan activamente para el crecimiento del ovocito (Hafez & Hafez, 2002)

El estímulo que desencadena el inicio de la maduración del ovocito es el aumento preovulatorio en los niveles de gonadotropinas, en especial la LH (Hafez & Hafez, 2002). Además de la reanudación de la meiosis, el

pico de la LH desencadena otras transformaciones dentro del folículo, como alteraciones en la esteroidogénesis folicular y cambios en el complejo cúmulus-ovocito (COCs) (Moor *et al.*, 1990).

La maduración nuclear es el paso de vesícula germinal (VG) a metafase II (MII) mediante la reanudación de la meiosis y conlleva: la disolución de la membrana nuclear conocida, la formación del huso meiótico y la condensación de la cromatina en cromosomas homólogos que se alinean en el huso, alcanzando entonces el estadio de metafase I; para continuar con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos, dando lugar a la extrusión del primer corpúsculo polar (CP) y al paso del ovocito al estadio de MII (Martínez, 2002). La maduración nuclear finaliza cuando el ovocito completa la primera división meiótica con la formación del primer CP, alcanzando el estadio de MII, unas 36-40 horas después del pico de LH, tras lo cual se produce la segunda detención de la meiosis (Hunter, 1988).

La maduración citoplasmática, en cambio, es un término más amplio que abarca una serie de acontecimientos; se produce una redistribución de las mitocondrias, de los gránulos corticales (GC) (Cran, 1985) y de una reprogramación de la síntesis proteica (Thibault *et al.*, 1987).

2.2.5 Ovulación

El pico preovulatorio de LH, inducido por el estradiol producido por los folículos preovulatorios, desencadena finalmente la ovulación (Stromstedt y Byskov, 1999). La LH también estimula la luteinización de las células de la pared de los folículos ovulados, es decir su transformación de productoras de estrógenos a productoras de progesterona, que será la principal hormona esteroidea producida por el cuerpo lúteo tras la ovulación (Geisert, 1999).

Este proceso ocurre entre 30-40 h de iniciado del estro, con una duración de 1 a 3 horas. El número de ovocitos liberados durante la ovulación es variable, oscilando entre 10 y 24; y se encuentran en estadio de MII con el primer CP separado y rodeados por las células del *cúmulus* y por líquido folicular viscoso (Geisert, 1999).

2.2.6 Recolección y transporte de ovarios

Los ovarios son obtenidos después del faenamiento de las hembras. Los ovarios recolectados de los animales faenados son transportados en termos que contienen suero isotónico de 35 a 37°C. La aspiración del complejo *cúmulus* ovocito (COCs), se realiza aproximadamente dentro de 4 a 6 horas luego de faenar al animal (Fernández *et al.*, 2007).

2.2.6.1 *Métodos de recuperación de ovocitos de animales muertos.*

- a) **Método de aspiración folicular:** La técnica de aspiración se recolectan ovocitos de folículos antrales, y tienden a ser más competentes a ser cultivados in vitro (Izquierdo et al., 2002) . Consiste en la aspiración de los folículos de 3 a 6 mm situados en la superficie del ovario por medio de una aguja hipodérmica. El diámetro de la aguja utilizada es 20-22G, unidas a jeringas de 3 a 20 ml (Fernández et al., 2007).

- b) **Método de corte folicular:** Se descubrió que el rendimiento podría mejorarse cortando el tejido para llegar a los folículos corticales profundos. Sin embargo, la desventaja es que el corte requería mucho tiempo y aumentaba las posibilidades de sepsis Arav A. (2000). Consiste en colocar cada uno de los ovarios en placas Petri que contienen el medio de cultivo y se corta la superficie y el interior de los ovarios a lo largo y a través de este con hojas de bisturí, separadas entre corte por 2 mm (Fernández et al., 2007).

2.2.6.2 *Métodos de recolección de ovocitos de animales vivos.*

- a) **Laparotomía:** Consiste en sedar a los animales, seguida a esto realizar la laparotomía para exponer los ovarios y obtener los COCs mediante la aspiración de los folículos con la ayuda de una aguja

(20-22G) acoplado a una jeringa de 10mL (Martinez de Andino *et al.*, 2019)

- b) *Laparoscopia*:** Es una técnica menos invasiva que la anterior, consiste de un equipo con tres puertos de trocar: Cánula, una pinza de agarre y una fuente de luz cableada. La pinza de agarre se utiliza para tirar del mesosalpinx en diferentes direcciones para exponer las diferentes superficies de los ovarios, permitiendo así la aspiración de todos los folículos de >2 mm (Baldassarre, 2021)

- c) *Aspiración folicular guiada por ultrasonografía (opu)*:** Consiste en obtener los COCs mediante el uso de un sistema de aspiración folicular acoplado a un transductor transvaginal. El sistema de aspiración consiste en una bomba de vacío, sistema de aspiración y un tubo colector. Este método es menos invasivo que las anteriores y es repetible (Matoba *et al.*, 2014; Yoshioka *et al.*, 2020). Otra variante de este método es el empleo en la laparoscopia (LOPU) (Baldassarre y Karatzas, 2004).

2.2.7 Clasificación de ovocitos

La clasificación de los ovocitos para su cultivo in vitro se basa en el número de capas del cúmulo que le rodea, se clasifican en cuatro grupos,

dividiendo los ovocitos con cúmulo completo en dos tipos 1 y 2 según la compactación de sus capas (Bracket, 1999).

2.2.8 Maduración in vitro de ovocitos porcinos

Es un proceso que consiste en la maduración nuclear y citoplasmática. El ovocito maduro a nivel nuclear puede ser claramente identificado como aquél que reanuda la meiosis y alcanza el estadio de MII; mientras que la maduración citoplasmática, término que abarca una serie de acontecimientos no directamente relacionados con la progresión de la meiosis pero que van a preparar al ovocito para la fecundación y el desarrollo embrionario posteriores (Abeydeera, 2002).

Las condiciones físicas específicas del ambiente en el que se maduran los ovocitos (osmolaridad, pH y composición iónica del medio; temperatura y tensión de CO₂ y O₂ del incubador; volumen de cultivo; y tiempo de incubación), así como la mayor o menor definición del medio de maduración utilizado (suero, células somáticas, etc.) van a influir en la maduración de los ovocitos (Holm & Callesen, 1998).

La duración del cultivo durante la MIV de los ovocitos porcinos oscila desde 36 horas (Yoshida *et al.*, 1993) hasta 48 horas (Naito *et al.*, 1988), pasando por 40 horas (Funahashi y Day, 1993) y 44 horas (Wang *et al.*, 1997). Según Ka *et al.* (1997) un cultivo de 36 horas es suficiente para

completar los procesos de maduración nuclear y citoplasmática, mientras que Yamauchi *et al.* (1996) apuntan que el período óptimo de cultivo es de 42-44 horas.

La temperatura de incubación más utilizada, tanto en la MIV, la FIV y el CE es de 38,5°C ó 39°C (Abeydeera *et al.*, 2001). Por otro lado, Chong *et al.* (2018) confirmó que la temperatura y el tiempo óptimos de cultivo durante la MIV son 39°C y 44 horas.

El ambiente de cultivo empleada como rutina en los protocolos de PIV de embriones porcinos es de 5% de CO₂ y 95% de humedad. La utilización de incubadores con baja tensión de oxígeno (5-7%), no es frecuente en porcino (Fernández *et al.*, 2007)

2.2.9 Medios de maduración in vitro

Existen diversos medios de maduración entre ellos: medios sencillos ampliamente utilizados en la MIV de ovocitos porcinos son el medio Whitten (Funahashi *et al.*, 1994), el medio KRB (Krebs Ringer Bicarbonato) (Naito *et al.*, 1988), y el medio NCSU23 (*North Carolina State University*) (Abeydeera *et al.*, 1998), que se suelen preparar en el propio laboratorio. Entre los medios complejos más utilizados están el TCM199 (*Tissue Culture Medium 199*) (Zheng & Sirard, 1992) y el Waymouth (Yoshida *et al.*,

1993) que, debido al elevado número de componentes, se suelen adquirir en preparados comerciales.

Por otro lado, la tendencia actual es el uso de medios definidos en vez que los indefinidos, pues estos últimos contienen factores desconocidos que impiden la estandarización de protocolos y la repetibilidad de los experimentos (Abeydeera, 2002; Casas *et al.*, 2010)

2.3 Marco conceptual

Complejo *cúmulus* ovocito: Conjunto de células que rodean al ovocito (Galina, 2008).

Folículo: Es una estructura en el que el ovocito es almacenado hasta su maduración y liberación (Hafez & Hafez, 2002).

Maduración *in vitro*: Consisten en obtener el desarrollo del núcleo y citoplasma del ovocito fuera del cuerpo del animal (Hafez & Hafez, 2002).

Meiosis. Es el proceso mediante el cual se producen células haploides o gametos (Galina, 2008).

Mitosis. Proceso en el que se obtienen dos núcleos idénticos en preparación para la división celular (Galina, 2008).

Ovario: Es el órgano reproductor de la hembra, que producen y secretan de hormonas sexuales y ovocitos (Galina, 2008).

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Ubicación Geográfica y Temporal

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de reproducción animal de la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna ubicado a latitud sur $17^{\circ}59'38''$ y latitud oeste $70^{\circ}14'22''$ y a una altitud promedio de 550 msnm en la provincia de Tacna; con temperatura que fluctúa entre 22 a 30° en época de verano y 10 a 24° de temperatura en época de invierno. Los ovarios de porcinos fueron recolectados en el Camal Municipal de Tacna que se encuentra en el Distrito de Calana y trasladados al laboratorio.

3.2 Materiales

3.2.1 Equipos de laboratorio

- Microscopio de contraste de fases
- Baño María.
- Incubadora de CO₂
- Platina térmica

- Estereomicroscopio
- Balanza analítica

3.2.2 Material de laboratorio

- Micropipetas
- Puntillas para micropipeta de 0,5 - 10 ul
- Puntillas para micropipeta de 20 – 100 ul
- Puntillas para micropipeta de 1 00 - 1 000 ul
- Placa petri 35 x 10 mm
- Placa petri 90 x 15 mm
- Tubo Falcon graduado de 15ml
- Tubo Falcon graduado de 50ml
- Vasos precipitados de 50ml
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Pipetas de 500ml
- Rollos de papel toalla
- Pliegues de filtro de 25mm p/jeringa 0,2 um.
- Guantes quirúrgicos

3.2.3 Reactivos e insumos químicos

Medio de maduración (IVM):

- Medio de cultivo de tejido TCM-199 polvo (M 5017)
- Bicarbonato de sodio NaHCO₃
- HEPES
- Agua químicamente pura (Agua mili Q)
- Suero bovino fetal (SFB)
- Hormona folículo estimulante (FSH)
- Piruvato de sodio (Py)
- Gentamicina stock
- Estradiol17- β

Fijación y tinción:

- Fijador carnoy
- Orceína acética 1%

3.3 Diseño experimental

Los ovarios colectados del camal fueron distribuidos en dos tratamientos; 34 ovarios para cada uno. El tratamiento 1, corresponde a la técnica de aspiración folicular y tratamiento 2, a la técnica de corte. Para cada tratamiento se determinó el número de ovocitos recuperados expresados en promedio de ovocitos recuperados por ovario, además se evaluó la calidad de ovocitos clasificados en grado I, II, III y IV, los resultados fueron expresados en porcentajes; finalmente, se evaluó la maduración nuclear mediante una tinción, se consideró un ovocito maduro si se encuentra en el estadio de metafase II, los resultados fueron expresados como variables discretas y complementado en porcentajes.

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1 Técnica de recolección de datos

A. Colecta de ovarios del centro de beneficio. La colección de ovarios de porcinos (n=68) se obtuvieron de 34 porcinos del centro de beneficio de la municipalidad de Tacna. Los ovarios fueron transportados hacia el laboratorio de biotecnología reproductiva animal dentro de termo con solución fisiológica, más antibiótico a temperatura de 25 °C. Dentro del laboratorio los ovarios fueron lavados 2 veces con suero fisiológico atemperado a 37°C y colocado

en baño María y divididos en dos grupos para la recuperación de Complejo Cúmulus Ovocitos (COCs).

B. Recuperación de COCs por la técnica de Aspiración Folicular.

Los ovarios (n=35) fueron sujetados con papel toalla estéril se procedió a aspirar los folículos de 3 a 5 mm, con una jeringa de 10 ml y aguja de 20G, una vez aspirados todos los folículos el contenido fue colocado en una placa Petri de 90x30 mm y se procedió a realizar la búsqueda de los COCs con un estéreo microscopio y a la vez fueron categorizados los COCs según las células del cúmulo que lo rodea y la condición del citoplasma

C. Recuperación de COCs por técnica de corte. Los ovarios (n=36)

fueron colocados sobre una placa Petri, la cual contenía el medio de mantenimiento y con una pinza simple se sujetó el ovario y se procedió a realizar cortes longitudinales sucesivos de la superficie ovárica con bisturí, finalmente los COCs fueron recuperados del medio de manteniendo y fueron categorizados los COCs como en la técnica anterior.

D. Clasificación de la calidad de los COCs. La calidad de los COCs

se categorizó en cuatro grados de acuerdo a los criterios señalados por Bertoldo et al. (2010):

- calidad A: COCs con más de tres capas de células del cúmulus compactas y con citoplasma homogéneo.
- calidad B: COCs con 2 a 3 capas de células del cúmulo compactas y con citoplasma homogéneo.
- calidad C: ovocitos rodeados de forma continua por 1 o 2 capas de células del cúmulus.
- calidad D: COCs con células del cúmulo expandido

- E. Maduración *in vitro*.** Todos los COCs recuperados de grado A, B y C fueron sometidos para la maduración *in vitro*, mientras que los de las categorías D fueron descartados. Fueron colocados en el medio de maduración de TCM-199 suplementado con Piruvato de sodio a una concentración de 0,2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0.02 unidades/ml, estradiol 17- β 1 µg/ml y SFB al 10%. Luego se colocaron en placas con 4 pozos con 500 µl de medio de maduración y puestos en grupo de 20 COCs y finalmente fueron cultivados a 38,5°C por un período de 48 horas en una incubadora de cultivo con una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 99% de humedad relativa
- F. Evaluación de la maduración nuclear ovocitaria.** Culminado el tiempo de maduración, los COCs fueron colocados en gotas de hialuronidasa y se realizó aspiraciones sucesivas para la eliminación

de las células del cúmulus, luego fueron colocados en una solución de fijación conteniendo etanol y ácido acético (3:1), y almacenados a 4°C en refrigeración por 24 horas. Para la tinción, se colocaron 5 a 10 ovocitos por lámina, cubiertos con un cubre objeto sujeto en las cuatro puntas con acetona. Se agregó la tinción de orceína al 1% durante 2-3 minutos, permitiendo que la solución penetre entre la porta y el cubreobjetos por capilaridad. Finalmente, con ayuda de un microscopio invertido (200x) se determinó los estadios de maduración nuclear de los ovocitos, considerándose vesícula germinal (GV), metafase I (MI), anafase-telofase I (A-T), metafase II (MII).

3.5 Análisis estadístico

Para comparar dos técnicas de recuperación de ovocitos sobre la cantidad de ovocitos, calidad de ovocitos y de maduración *in vitro*, se realizó una prueba previa sobre de relación de variables mediante el estadístico Chi-cuadrada, para luego comparar tratamientos (aspiración y corte), utilizando la prueba de comparación de Wilcoxon Rank debido a que las variables discretas no se ajustó a normalidad y variabilidad. Complementariamente los resultados son expresados en porcentajes (%),

con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. Se utilizó el Software R studio (versión 4.1.6).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Número de ovocitos recuperados según técnica de aspiración folicular y corte.

En las Tablas 1 y 2 se muestran los resultados sobre el número de COCs recuperados, calidad de COCs y el número de ovocitos destinados a la maduración in vitro (MIV) según la técnica de aspiración folicular y corte, respectivamente. Los ensayos se realizaron en 4 grupos de ovarios para ambas técnicas, realizándose 7 evaluaciones para la técnica de aspiración folicular y 11 para la técnica de corte.

Tabla 1.

Recuperación de COCs por la técnica de aspiración folicular.

Ítems	Nº OVARIOS	CATEGORÍA DE COCs				Total de COCs	Nº COCs para MIV
		A	B	C	D		
1	7	6	9	27	22	64	42
2	10	9	10	0	10	29	19
		5	10	29	0	44	44
3	9	0	25	2	0	27	27
		2	3	20	11	36	29
4	8	6	3	17	0	26	28
		1	9	21	18	49	31
TOTAL	34	29	69	116	61	275	220

Tabla 2.

Recuperación de COCs por la técnica de corte.

Ítems	Nº OVARIOS	CATEGORÍA DE COCs				Total de COCs	Nº COCs para MIV
		A	B	C	D		
1	8	9	15	25	27	76	49
		5	18	25	20	68	48
2	9	4	23	0	35	62	29
		6	13	0	0	19	21
		5	31	0	0	36	39
		7	9	5	0	21	22
		7	6	21	18	52	37
3	9	2	1	19	0	22	27
		1	3	38	13	55	43
		1	3	19	0	23	24
4	8	15	7	20	17	59	42
Total	34	62	129	172	130	493	381

En la tabla 3, se observa los resultados de números de ovocitos recuperados usando dos técnicas de recuperación de complejos cumulo ovocitos. En total se trabajó con 68 ovarios, de los cuales para la técnica de aspiración folicular se procesó 34 ovarios, obteniéndose en total 275 COCs y en promedio se recuperó 8,09 COCs/ovario. Por otro lado, para la técnica de corte se utilizaron 34 ovarios y se obtuvo en total 493 COCs, siendo el promedio de recuperación 14,50 COCs/ovario. Al análisis estadístico se encontró diferencia significativa para el número de COCs según tratamiento ($P > 0,05$), mas no así para el número de COCs por ovario ($P < 0,05$).

Tabla 3.

Número de ovocitos recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte

Tratamiento	Nº de ovarios	Nº COCs*	Promedio de COCs
Aspiración	34	275	8,09
Corte	34	493	14,50
Total	68	768	11,29

Nota. * indica diferencia significativa ($P < 0,05$)

Los resultados de prueba de comparación de Wilcoxon Rank, mediante lenguaje de programación R studio, que se realizó comparando dos técnicas de aspiración y corte para el número de COCs recuperados son los siguientes: el valor p calculado es 0,6244, este valor es mayor que el nivel de significancia utilizado, como 0,05 ($P > 0,05$). Esto significa que no hay suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula. En términos simples, no se encontró una diferencia significativa entre las dos técnicas de aspiración y corte en términos de su efecto sobre el número de COCs recuperados.

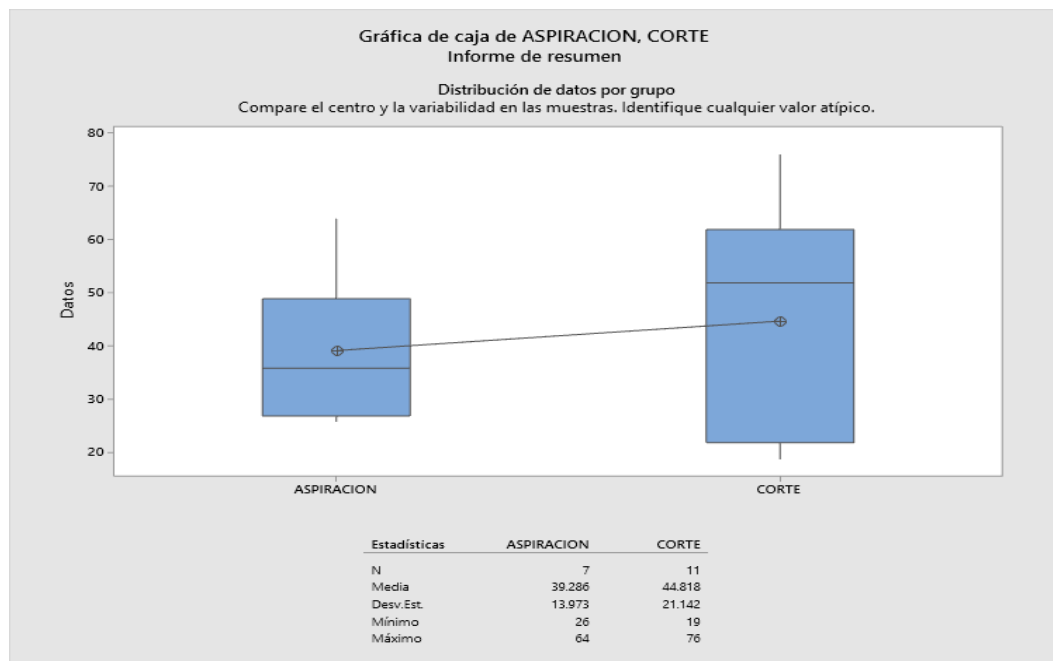


Figura 1.

Gráfica de cajas para el número de COCs recuperados según técnica de aspiración folicular y corte.

4.2 Calidad de ovocitos recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte

En la tabla 4 y figura 2, se muestra los resultados sobre la calidad de los complejos cúmulos ovocitos recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte. La clasificación de los COCs se realizó según el número de células que rodea al ovocito y el aspecto del citoplasma. Donde, los 275 COCs recuperados por la técnica de aspiración se

clasificaron en 10,55% de calidad A, 25,09% de calidad B, 42,18% de calidad C y 22,18% de calidad D. Con respecto con la técnica de corte, los 493 COCs se clasificaron en 12,58% de calidad A, 26,17% de calidad B, 34,89% de calidad C y 26,37% de calidad D.

Según prueba de Chi cuadrado evidencia como resultado una estadística de prueba ($X^2_{\text{calculado}}$) es de aproximadamente 4,4422. Y el valor p de 0,2175 es mayor que el nivel de significancia típico de 0,05. Dado que el valor p no es significativo ($p > 0,05$), no se puede rechazar la hipótesis nula. Esto sugiere que no existe una relación significativa entre las técnicas de aspiración y corte en términos de variación en la calidad de los ovocitos. En resumen, según los resultados de la prueba Chi-cuadrado, no existe una relación significativa entre las técnicas de aspiración y corte con respecto a la variación en la calidad de los ovocitos.

Tabla 4.

Calidad de COCs recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte

Tratamiento	Nº Ovarios	Nº COCs*	Calidad de COCs			
			A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
Aspiración	34	275	29 (10,55)	69 (25,09)	116 (42,18)	61 (22,18)
Corte	34	493	62 (12,58)	129 (26,17)	172 (34,89)	130 (26,37)
TOTAL	68	768	91 (11,85)	198 (25,78)	288 (37,50)	191 (24,87)

Nota. *Indica diferencia estadística (P<0,05)

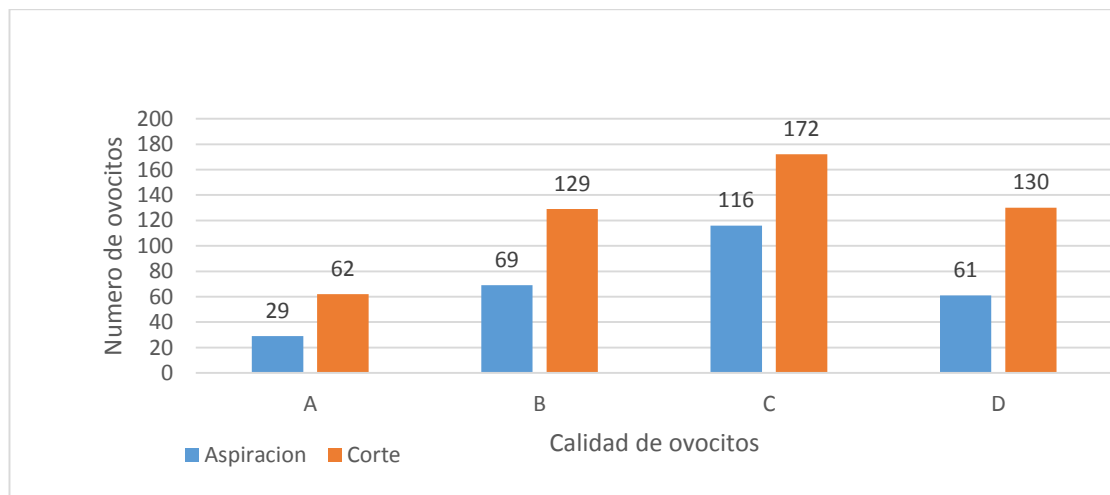


Figura 2.

Calidad de COCs según técnica de aspiración folicular y corte (n).

4.3 Tasa de maduración *in vitro* según la técnica de aspiración folicular y corte.

En la figura 3, se muestran los resultados de prueba de comparación de Wilcoxon Rank, mediante lenguaje de programación R studio, que se realizó comparando dos técnicas de aspiración y corte sobre el número de ovocitos seleccionados para la maduración *in vitro*: el valor p es 0,6911, este valor es mayor que el nivel de significancia utilizado, como 0,05 ($P > 0,05$). Esto significa que no hay suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula. En términos simples, no se encontró una diferencia significativa entre las dos técnicas de aspiración y corte en términos de su efecto sobre la selección de COCs para la MIV.

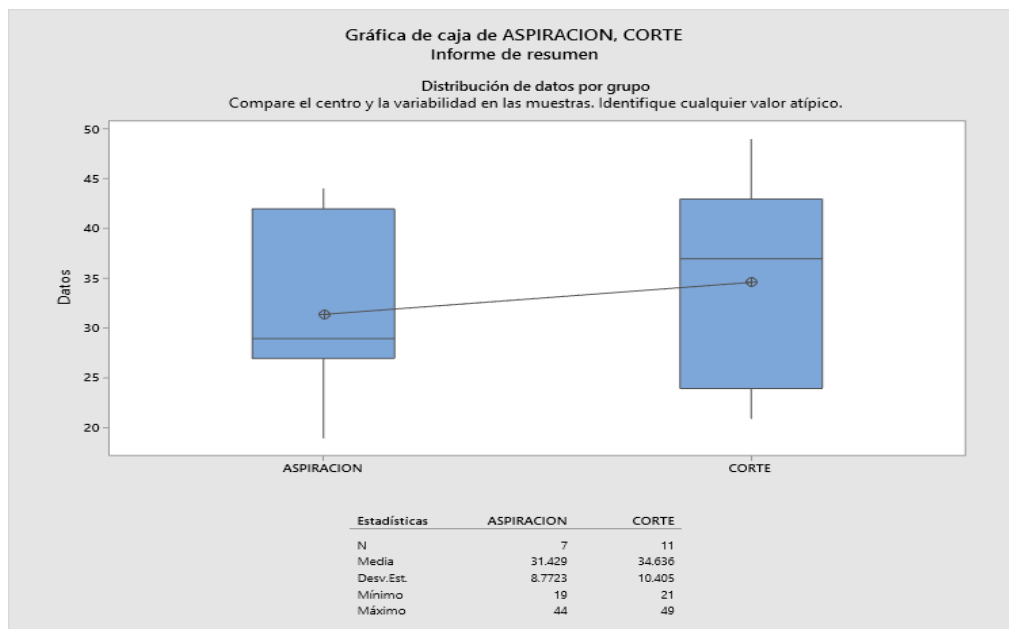


Figura 3.

Grafica de cajas para COCs seleccionados para MIV según técnica de recuperación.

En la tabla 5 y figuras 4 y 5, se muestra los resultados sobre la tasa de maduración nuclear in vitro de ovocitos recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte. Con la técnica de aspiración se maduraron 147 COCs, resultando 5,44% en VGBR, 33,33% VG, 1,36% T, 1,36% AT 29,93% MII y 12,93% degenerados y con la técnica de corte se maduraron 299 COCs, obteniendo 25,42% para VGBR, 27,42% VG, 0% T, 3,01% AT, 22,07% MII y 11,71% degenerados. Según prueba de Chi cuadrado evidencia como resultado una estadística de prueba ($X^2_{\text{calculado}}$) de

aproximadamente 32,00, el valor p de 0,0001 es menor que el nivel de significancia típico de 0,05. Dado que el valor p es significativo ($p > 0,05$) esto sugiere que existe una relación significativa entre las técnicas de aspiración y corte en términos de variación en la maduración de los ovocitos. En resumen, según los resultados de la prueba Chi-cuadrado, existe una relación significativa entre las técnicas de aspiración y corte con respecto a la variación en relación a la maduración de los ovocitos.

Tabla 5.

Tasa de maduración nuclear in vitro de ovocitos según la técnica de aspiración folicular y corte

Tratamiento	N° ovocitos	Estadio de Maduración de ovocitos						
		VGBR* (%)	VG* (%)	T (%)*	AT* (%)	MI* (%)	MII* (%)	Degenerado* (%)
Aspiración	147	8 (5,44)	49 (33,33)	2 (1,36)	2 (1,36)	23 (15,65)	44 (29,93)	19 (12,93)
Corte	299	76 (25,42)	82 (27,42)	0 (0)	9 (3,01)	31 (10,37)	66 (22,07)	35 (11,71)
TOTAL	446	84 (18,83)	131 (29,37)	2 (0,45)	11 (2,47)	54 (12,11)	110 (24,66)	54 (12,11)

Nota: * Indica diferencia estadística ($P < 0,05$). VGBR=Vesícula germinal fragmentado;

VG=Vesícula germinal; T=Telofase, AT=Anafase-Telofase, MI=Metafase-I; MII=Metafase-

II

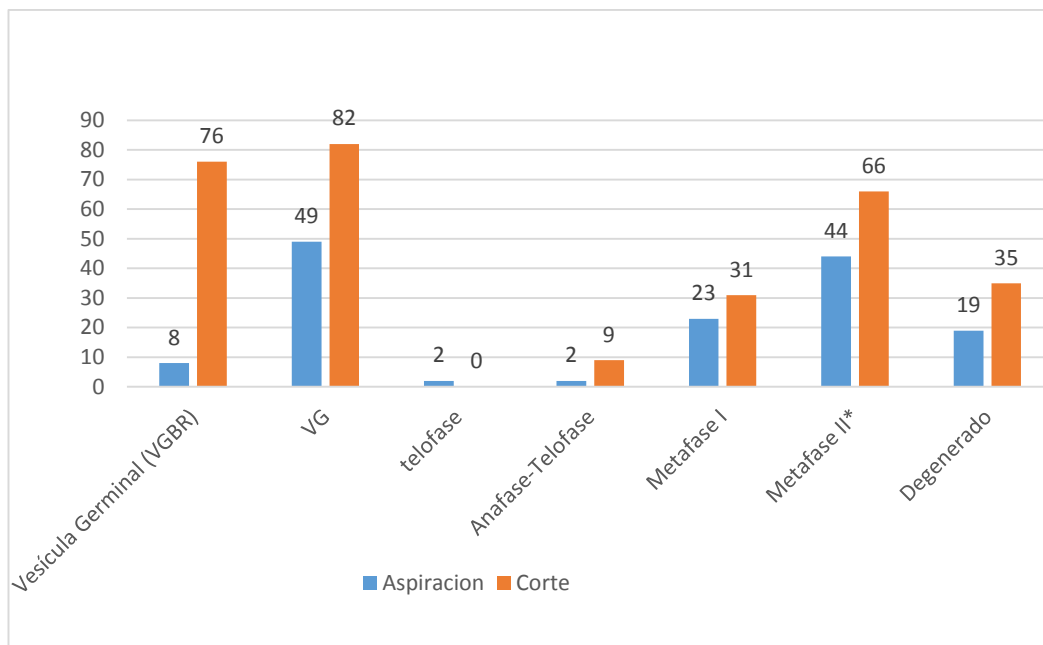
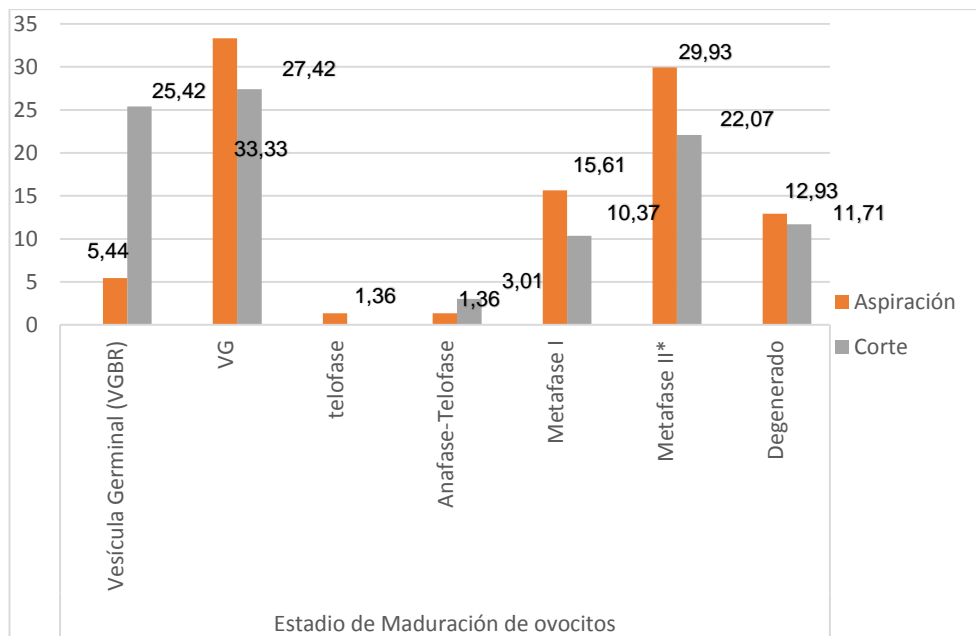


Figura 4.

Frecuencia absoluta de estadio de maduración de ovocitos según técnica de recuperación.

Figura 5.

Frecuencia relativa (%) de estadio de maduración de ovocitos según técnica de recuperación



Contrastación de hipótesis

1.- Numero de COCs

Ho: la recuperación del número de COCs es similar entre las técnicas de aspiración folicular y corte.

Ha: la recuperación del número de COCs es diferente entre las técnicas de aspiración folicular y corte.

Prueba Estadística:

Wilcoxon de Rangos y Signos

$W = 33,5$; $p\text{-value} = 0,64$

Nivel de significancia:

$\alpha = 0,05$

Decisión:

$p\text{-value} (0,64) > 0,05$, por tanto, no se rechaza la hipótesis nula.

Conclusión:

Al análisis estadístico no muestra diferencia significativa entre tratamientos, es decir el número de COCs recuperados fue similar entre las técnicas de aspiración folicular y corte en porcinos.

2.- Calidad de COCs**Contrastación de hipótesis:**

Ho: la calidad de COCs es similar entre las técnicas de aspiración folicular y corte.

Ha: la calidad de COCs es diferente entre las técnicas de aspiración folicular y corte.

Nivel de significancia:

$\alpha = 0,05$

Prueba Estadístico:

Chi-Cuadrada

X-squared = 4,4422, df = 3, p-value = 0,2175

Decisión:

p-value (0,2175) > 0,05, por tanto, no se rechaza la hipótesis nula.

Conclusión:

Los resultados obtenidos en cuanto a calidad de COCS es similar entre las técnicas de aspiración folicular y corte en porcinos.

3.- Maduración *in vitro*

Contrastación de hipótesis:

Ho: el estadio de maduración *in vitro* es similar entre las técnicas de aspiración folicular y corte en ovocitos de porcinos.

Ha: el estadio de maduración *in vitro* es similar entre las técnicas de aspiración folicular y corte en ovocitos de porcinos.

Nivel de significancia

$\alpha = 0,05$

Estadístico

Chi-Cuadrada

X-squared = 32,062, df = 6, p-value = 0,000015

Decisión:

p-value (0,000015) < 0,05, por tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

Conclusión:

El estadio de maduración *in vitro* es diferente entre las técnicas de aspiración folicular y corte, obteniéndose una mayor tasa de maduración por la técnica de aspiración folicular en ovocitos de porcinos.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1 Número de ovocitos recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte

En el estudio se encontró mayor número de COCs por ovario con la técnica de corte que por el de aspiración folicular. Estos resultados coinciden con lo observado por Lorenzo et al. (2015) en porcinos, que obtuvieron en promedio 26 COCs/ovario mediante la técnica de corte y 12 COCs/ovario por aspiración folicular. Similares resultados fueron publicados en otras especies, así como Vasquez et al. (2015) en alpacas y llamas encontraron mayor número de COCs por la técnica de corte que por aspiración.

Estos resultados evidencian que la recuperación de COCs es más eficiente con la técnica de corte que por aspiración, debido a que con la técnica de corte se liberan tanto de folículos superficiales como de los que se encuentran en el estroma de la corteza ovárica, aprovechando mejor la

recuperación de COCs, mientras que con la técnica de aspiración folicular la recuperación se realiza sólo de folículos visibles en la superficie del ovario, razón por la que recuperación es menor que otras técnicas (Abdoon et al., 2014), además, la recuperación de COCs en hembras prepúberes por la técnica de aspiración es dificultoso por el tamaño folicular presentes en la superficie del ovario, de manare que, la técnica recomendable en estos animales es la de corte (o *Slicing*) (Anguita, et al. 2007)

Por otro lado, en contraste con publicaciones previas, se encontró diferencias en cuanto al número de COCs recuperados, tanto para la técnica de corte como para aspiración folicular, esto puede deberse a la experiencia del operario, ya que a mayor experiencia mayor recuperación de COCS, así como la especie, edad, estadio reproductivo y estado nutricional de los animales (Abdoon et al., 2014).

5.2 Calidad de ovocitos recuperados según la técnica de aspiración folicular y corte

Con respecto a la calidad de COCs, no se encontró diferencia entre las técnicas de corte y aspiración folicular, estos resultados coinciden con lo reportado por Lorenzo et al. (2015), quienes no encontraron diferencias en entre ambas técnicas. Mientras, Fernández et al. (2010) en porcinos,

reportaron una ligera ventaja de COCs de grado A y B (45%) con la técnica de corte con respecto a la técnica de aspiración folicular (43%).

La baja calidad de COCS recuperados con la técnica de aspiración folicular puede estar asociada con el daño de las células del cúmulus ejercidas por el diámetro de las agujas (20 G) empleadas en la recuperación de COCS, además puede ser afectada por la experiencia del operario, ya que una inadecuada presión de aspiración empleada puede reflejarse en una menor calidad de los COCs, así como en su evaluación, también puede verse afectado por la edad y estadio reproductivo de los animales y por el tiempo de transporte de ovarios del centro de beneficio al laboratorio (Abdoon et al., 2014).

5.3 Tasa de maduración *in vitro* según la técnica de aspiración folicular y corte.

Los ovocitos que llegaron con mayor porcentaje de maduración nuclear (Metafase II, MII) fue por la técnica de aspiración. Estos resultados son similares a lo reportado por Lorenzo et al. (2015) donde los COCs obtenidos por la técnica de aspiración folicular presentaron un 57,5% de maduración y por corte un 33,3%, evidenciando diferencia significativa. De igual manera en cabras reportan mayor tasa de maduración de los ovocitos con la técnica de aspiración (40,63%) que por corte (30,84) (Majeed et al.,

2011). Por otro lado, Fernández et al. (2010) no encontró diferencias entre ambas técnicas.

En numerosos estudios reportan la relación del tamaño del ovocito con el tamaño del folículo y los que son de menor tamaño no tendrían la capacidad de una maduración meiótica y por ende bajo porcentaje de desarrollo embrionario *in vitro* (Anguita et al., 2009).

CONCLUSIONES

- Con la técnica de aspiración folicular se logran obtener ovocitos de buena calidad y competencia para la maduración in vitro.
- El número promedio de ovocitos recuperados por ovario muestran diferencias significativas entre técnicas de aspiración folicular y corte.
- La calidad de complejo cúmulos ovocitos son similares entre corte y aspiración folicular.
- Los mayores porcentajes de maduración nuclear in vitro se obtienen con la técnica de aspiración folicular.

RECOMENDACIONES

- Realizar nuevos trabajos de investigación, para estandarizar el protocolo de maduración in vitro mediante la obtención de ovocitos por la técnica de aspiración.
- Para obtener mejores porcentajes de maduración in vitro en ovocitos de porcinos, se recomienda usar la técnica de aspiración como fuente de información según nuestros resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeydeera, L. (2002). In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*; 57: 257-273.

Abeydeera, L., Wang, W., Prather, R. & Day, B. (2001). Effect of incubation temperature on in vitro maturation of porcine oocytes: nuclear maturation, fertilization and developmental competence. *Zygote*; 9: 331-337.

Abeydeera, L., Wang, W., Cantley, T., Rieke, A. & Day, BN. (1998). Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol Reprod*; 58: 213-218.

Abdoon, A. S., Abdel-Rahman, H. A., Shawki, S. M., Kandil, O. M., & Fathalla, S. I. (2014). Influence of follicle size, methods of retrieval on oocytes yield and morphology in Egyptian Jennies ovaries with special reference to maturation rate in vitro. *Veterinary research communications*, 38(4), 287–295. <https://doi.org/10.1007/s11259-014-9617->

Albarran, E. & Calderón, R. (2007). *Inseminación artificial y Andrología*

Veterinaria. Tomo 1, Editorial Felix Varela, La Habana, ISBN: 9682446481.

Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2003). *World agriculture: towards 2015/2030: an FAO perspective*. Land Use Policy; 20:375.

Albarracín, I. (2005). *Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica Open Pulled Straw: Estudio estructural de cromosomas microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, ISBN: 9582436371

Anguita, B., Paramio, M. T., Morató, R., Romaguera, R., Jiménez-Macedo, A. R., Mogas, T., & Izquierdo, D. (2009). Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cúmulus cells on embryo development in prepubertal goats. *Animal reproduction science*, 116(1-2), 95–106.

Arav A. 2000. Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology* 55: 1561-156

Azada, D. (2008). *Criopreservación de ovocitos y fertilización in vitro en bovinos*. Primera Edición, ISBN: 698352124530.

- Baldassarre, H. (2021). Laparoscopic Ovum Pick-Up Followed by In Vitro Embryo Production and Transfer in Assisted Breeding Programs for Ruminants. *Animals* 11, 216. <https://doi.org/10.3390/ani11010216>
- Baldassarre H., & Karatzas, C. (2004). Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci.* 82–83:255–266
- Benavides, I., Huanca L. & Quintanilla M. (2015). Efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno sobre el Desarrollo de Ovocitos Bovinos Fecundados y Cultivados in vitro. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 26(4), 596. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11215>.
- Bertoldo M, Holyoake PK, Evans G, Grupen CG. 2010. Oocyte developmental competence is reduced in sows during the seasonal infertility period. *Reprod Fert Develop* 22: 1222-1229. doi: 10.1071/RD10093
- Bracket, G. (1999). *Avances en Zootecnia: Nuevas técnicas de reproducción en cerdos*. Editorial Acribia Zaragoza, ISBN: 9714574116
- Castillo, J. (2020). Evaluación de la calidad de ovocitos ovinos obtenidos mediante aspiración folicular empleando cuatro presiones de vacío. *Orphanet Journal of Rare Diseases*.2: 12-15.

Carrasco, S. (2021). Peruvian Pork Industry Analysis. Consejo de Comercio de Dinamarca. <https://thetradecouncil.dk/publikationer/market-study-on-the-peruvian-pork-industry>

Casas, E., Bonilla, E., Ducolomb, Y. & Betancourt, M. (2010). Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicol. In Vitro*, 24, 224-230. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.09.004.

Coy, P., & Romar, R. (2002). *In vitro* production of pig embryos: A point of view. *Reproduction, Fertility and Development*, 14(5–6), 275–286. <https://doi.org/10.1071/RD01102>

Chen, P., Redel, B., Kerns, K., y Spate, L. & Prather, R. (2021). Challenges and Considerations during In Vitro Production of Porcine Embryos. *Cells* 10, 2770. <https://doi.org/10.3390/cells10102770>

Chong, F., Bahena, I., Casas, E., Betancourt, E., Ducolomb, Y., González, C., Cuapio, P. & Bonilla, E. (2018). La ATPasa 6 participa en la maduración de ovocitos de cerdo in vitro. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2): 85-90. DOI: 10.22201/fesz.23958723e..2.1

- Cran, D. (1985). Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *J Reprod Fertil*; 74: 237-245
- Espinoza, J. (2009). *Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos*. Colombia: Munera.
- FAO. (2021). The state of food and agriculture 2021. Accessed 25 agosto 2022. <http://www.fao.org/3/a-i3028e.pdf>.
- Fernández, F., Hernández, J., & Pichardo, A. (2007). maduración in vitro de ovocitos de ovino usando concentraciones de fsh+ lh & fsh en medio de cultivo. *Revista de Salud Animal*, 29(2), 105-110.http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-110&ipt=sci_arttext&tlng=es
- Fernandez, F., Hernández, J., & Reyes, M. (2010). Maduración & fertilización in vitro de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. *Revista de Salud Animal*, 32(2), 78–83.http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2010000200002
- Fowler, K., Mandawala, A., Griffin, D., Walling, G. & Harvey, S. (2018). The production of pig preimplantation embryos in vitro: Current progress and future prospects. *Reproductive Biology* 18: 203–211

Funahashi, H. & Day, B. (1993). Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil*; 98: 179-185

Funahashi, H. & Day, B. (1997). Advances in in vitro production of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl.* 1997;52:271-83. PMID: 9602735.

Funahashi, H., Cantley, T., Stumpf, T., Terlouw, S. & Day, B. (1994). Use of low-salt culture medium for *in vitro* maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol Reprod*; 51: 633-639

Galina, C. (2008). *Reproducción de Animales Domésticos*. Tercera Edición. Editorial LIMUSA. México.

García, M. (2015). *Optimización de las estrategias reproductivas de micro manipulación para la producción in vitro de embriones*. Tesis de Doctoral Universidad Politécnica de Valencia, España.

Geisert, R. (1999). *Pigs*. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil y JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA; Vol 3: 792-799

Gruppen, C. (2014). The evolution of porcine embryo in vitro production. *Theriogenology*, 81(1), 24–37.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.022>

Hafez, E. & Hafez, B. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ed. México. McGraw Hill Interamericana.

Hunter, R. (2000). The evolution of porcine embryo in vitro production. *Theriogenology*, 81(1), 24–37.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.022>

Hunter, R. (1988). *The Fallopian tubes. Their role in fertility and infertility*. Springer-Verlag, Berlin, Germany,

Holm, P. & Callesen, H. (1998). In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev*, 38: 579-594

Izquierdo, D.; Villamediana, P.; Lopez-Bezar, M. & Paramio, M. T. (2002). Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*, 57: 1431- 1441.

INEI, (2021). Instituto Nacional de Estadística e Informática. Visitado el 30 de Agosto. <https://www.inei.gob.pe/estadisticas/encuestas/>

Ka, H., Sawai, K., Wang, W., Im, K. & Niwa, K. (1997). Amino acids in maturation media and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro. *Biol Reprod*, 57: 1478-1483

- Lorenzo, M., Tello, M., Fischman, M., Claver, J. & Lombardo, D. (2015). Comparación de dos técnicas para la obtención de complejos cúmulus ovocito porcinos. *InVet*, 17(1), 25–34.
- Majeed A.F, Saied L.H, & AL-Saigh M.N. (2011). Effect of collection techniques on recovery, and in vitro maturation of Black Iraqi Goats oocytes. *Al-Anbar J. Vet. Sci.*, Vol.: 4 No. (2),
- Mamani, W. (2013). *Diagnóstico de la producción de porcinos (Sus scrofa domestica) en la provincia de Tacna*. Tesis para la obtención de grado profesional. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.
- Marinome, A.I, Kaiser G., Hozbor F., & Mucci N. (2018). Biotécnicas Reproductivas en la especie porcina: pasad, presente y futuro. *Rev Argentina 4: 13-16*.
- Manjarrés, O. (2015). *Evaluación de las características de los ovocitos en cerdas de camal según condición corporal 2 3 y 4*. Tesis de grado. Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Mattioli, M., Bacci M.L., Galeati, G. & Seren, E. (1991). Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. *Theriogenology*. Jul;36(1):95-105. doi: 10.1016/0093-691x(91)90438-j. PMID: 16726982.

Martinez de Andino, Brom de Luna, J., Canesin, H., Rader, K., Resende, M., Ripley A., Love, C. & Hinrichs K. (2019). Intrafollicular oocyte transfer in the horse: effect of autologous vs. allogeneic transfer and time of administration of ovulatory stimulus before transfer. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 36:1237–1250

Martínez, B. (2002). *Studio de la fecundación in vitro en porcino: reducción de la polispermia y optimización de la producción in vitro de embriones*. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid.

Matoba, S., Yoshioka, H., Matsuda, H., Sugimura, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Hashiyada, Y., Seta, T., Nakagawa, K., Lonergan, P. & Imai, K. (2014). Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm. *J Dairy Sci*; 97:743e53.

Merton, J.S., de Roos, A.P., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P.L. & Dieleman S.J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59: 651-674. doi: 10.1016/S0093-691X(02)01246-3

Moor, R., Mattioli, M., Ding, J. & Nagai, T. (1990). Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil*; 40 (Suppl): 197-210.

Naito, K., Fukuda, Y. & Toyoda, Y. (1988). Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Res*; 21: 289-295

Özturkler, Y. (2002). In vitro developmental potential of electro-activated porcine oocytes collected by puncturation versus dissection. *Indian Vet J*;79:327-330.

Rodríguez, L. (2013). Optimización del método de recuperación de ovocitos para la fecundación in vitro. *Universidad de Santiago de Compostela*, 157. <http://hdl.handle.net/10347/9213>

Ruíz, J. (2013). VIII Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. *Situación Actual de La Producción de Camélidos Sudamericanos En Latinoamérica*, 88–95.

SENASA, (2021). Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú. Visitado el 28 de agosto. <https://www.gob.pe/senasa>

Stromstedt, M. & Byskov, A. (1999). *Oocyte, Mammalian*. In: Encyclopedia of Reproduction. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA; Vol 3: 468-480

Tilman, D., Cassman K., Matson, P., Naylor, R., & Polasky, S. (2002).

Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*; 418: 671–7.

Thibault, C., Szollosi, D. & Gerard, M. (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev*; 27: 856-896

Vasquez, N., Perez, M., Olivera, L., & Perez, U. (2015). Efecto de dos Métodos de Colección sobre la Cantidad y Calidad Ovocitaria de Alpacas (*Vicugna pacos*) y Llamas (*Lama glama*) POST MÓRTEM. *Rev. Investigacion Altoandina*; 17: 3:331-340

Wang, W., Abeydeera, L., Cantley, T. & Day, B. (1997). Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by in vitro fertilization. *J Reprod Fertil*; 111: 101-108

Yamauchi, N., Sasada, H., Sugawara, S. & Nagai, T. (1996). Effect of culture conditions on artificial activation of porcine oocytes matured in vitro. *Reprod Fertil Dev*; 8: 1153- 1156

Yoshida, M., Ishigaki, Y., Nagai, T., Chikyu, M. & Pursel, V. (1993). Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod*; 49: 89-94

Yoshioka, K., Uchikura, K., Tomoko, S. & Matoba, S. (2020). Production of

piglets from in vitro-produced blastocysts by ultrasound-guided ovum pick-up from live donors. *Theriogenology* 141; 113-119<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.019>.

Zheng, Y. & Sirard, M. (1992). The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology*; 37: 779-790

ANEXOS

Anexo 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN R STUDIO PARA RECUPERACIÓN DE COCs SE GÚN TÉCNICA DE RECUPERACIÓN

```
> aspiración<-c(64,29,44,27,36,26,49)
> corte<-c(76,68,62,19,36,21,52,22,55,23,59)
> wilcox.test(aspiracion,corte,alternative="greater")
```

```
wilcoxon rank sum test with continuity correction
```

```
data: aspiracion and corte
```

```
w = 35,5, p-value = 0,6244
```

```
0 alternative hypothesis: true location shift is greater than
```

ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN R STUDIO PARA NUMERO COCs DESTINADOS A MADURACIÓN IN VITRO SEGÚN TÉCNICA DE RECUPERACIÓN.

```
> library(agricolae)
> library(car)
> aspiracion<-c(42,19,44,27,29,28,31)
> corte<-c(49,48,29,21,39,22,37,27,43,24,42)
> wilcox.test(aspiracion,corte,alternative="greater")
```

```
wilcoxon rank sum test with continuity correction
```

```

data: aspiracion and corte
w = 33.5, p-value = 0.6911
alternative hypothesis: true location shift is greater than
0

```

***ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN R STUDIO PARA CALIDAD DE COCs SEGÚN
TECNICA DE RECUPERACIÓN.***

```

attach(SUJ1)
> names(SUJ1)
[1] "...1" "A"    "B"    "C"    "D"
> TA<-as.numeric(A)
> TB<-as.numeric(B)
> TC<-as.numeric(C)
> TD<-as.numeric(D)
> CUADRO<-cbind(TA,TB,TC,TD)
> rownames(CUADRO)<-c("Aspiracion","Corte")
> prop.table(CUADRO)

```

	TA	TB	TC	TD
Aspiracion	0.03776042	0.08984375	0.1510417	0.07942708
Corte	0.08072917	0.16796875	0.2239583	0.16927083

```

> chisq.test(CUADRO)

```

Pearson's Chi-squared test

```

data: CUADRO
X-squared = 4.4422, df = 3, p-value = 0.2175

```

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN R STUDIO PARA MADURACIÓN IN VITRO
SEGÚN TÉCNICA DE RECUPERACIÓN.**

```

library(readxl)
> SUJ2 <- read_excel("H:/SUJ2.xlsx")
New names:
* `` -> `...1`
> View(SUJ2)
> attach(SUJ2)
> names(SUJ2)
[1] "...1" "VGB"  "VG"   "TEL"  "AN"   "MEI"  "MEII" "FG"
> TVGB<-as.numeric(VGB)
> TVG<-as.numeric(VG)
> TTEL<-as.numeric(TEL)
> TAN<-as.numeric(AN)
> TMEI<-as.numeric(MEI)
> TMEII<-as.numeric(MEII)
> TDG<-as.numeric(DG)
> CUADRO<-cbind(TVGB,TVG,TTEL,TAN,TMEI,TMEII,TfG)
> rownames(CUADRO)<-c("Aspiracion","Corte")
> prop.table(CUADRO)

```

	TfG	TVGB	TVG	TTEL	TAN	TMEI	TMEII
Aspiracion	0.04260090	0.01793722	0.1098655	0.004484305	0.004484305	0,05156951	0.098654
Corte	0.07847534	0.17040359	0.1838565	0.000000000	0.020179372	0.06950673	0.147982

```
> chisq.test(CUADRO)
```

Pearson's Chi-squared test

data: CUADRO

X-squared = 32.062, df = 6, p-value = 1.587e-05