

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL ANTIOXIDANTE CLORHIDRATO
DE TRIS (2-CARBOXIETIL) FOSFINA (TCEP) SOBRE LA VIABILIDAD
Y MADURACIÓN DE OVOCITOS VITRIFICADOS EN FASE DE
VESÍCULA GERMINAL DE PORCINOS

TESIS

Presentada por:

Bach. MARTHA GABRIELA MERINO FERNÁNDEZ

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

TACNA – PERÚ

2025

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

"DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL ANTIOXIDANTE CLORHIDRATO DE TRIS (2-CARBOXIETIL) FOSFINA (TCEP) SOBRE LA VIABILIDAD Y MADURACIÓN DE OVOCITOS VITRIFICADOS EN FASE DE VESÍCULA GERMINAL DE PORCINOS"

Tesis sustentada y aprobada el 25 de septiembre del 2025, siendo el jurado calificador:

PRESIDENTE:
Dr. Daniel Gandarillas Espezúa

SECRETARIO:
MSc. Maribel Fortunata Medina Rojas

VOCAL:
MSc. Duany Condemayta Cutipa

ASESORA:
MSc. Elizabeth Soledad Chucuya Mamani

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **MSc. Elizabeth Soledad Chucuya Mamani**, en mi condición de asesora acreditada por la **Resolución de Facultad N° 8726-2024-FCAG** del trabajo de tesis titulado: **“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL ANTIOXIDANTE CLORHIDRATO DE TRIS (2-CARBOXIETIL) FOSFINA (TCEP) SOBRE LA VIABILIDAD Y MADURACIÓN DE OVOCITOS VITRIFICADOS EN FASE DE VESÍCULA GERMINAL DE PORCINOS”**, presentada por la **Bachiller MARTHA GABRIELA MERINO FERNÁNDEZ** para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajos 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 **12%**.

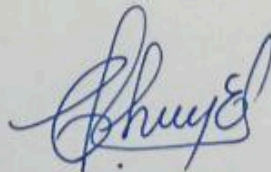
Por lo que **CERTIFICO LA SIMILARIDAD** de la tesis y está de acuerdo al nivel **PERMITIDO**, para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado con los fines de continuar con los trámites respectivos para su obtención del título de Médico Veterinario y Zootecnista.

Tacna, 13 de octubre del 2025

FIRMA ASESOR

Nombres y apellidos



.....
MSc. Elizabeth Soledad Chucuya Mamani
DNI N° 42044736



FIRMA TESISTA

Nombres y apellidos



.....
Bach. Martha Gabriela Merino Fernández
DNI N° 70253334



DEDICATORIA

A mis padres Yesenia y Antonio por su apoyo incondicional, esfuerzo y amor especialmente a lo largo de mis estudios académicos.

A mi abuelo Marcos y mi madrina Marilú, que me cuidan desde el cielo y cuyas vidas me inspiran para elegir el camino de la mía.

A mi hermano Mathias, para que sepa que las metas que más cuestan alcanzar también son las que más satisfacción dan en la vida.

AGRADECIMIENTO

A toda mi familia y amistades más cercanas que me ayudaron y motivaron para seguir adelante con este trabajo de investigación hasta lograr la meta.

A mi asesora la Msc. MVZ Elizabeth Chucuya por su paciencia y enseñanzas en todo el proceso para realizar la tesis y por la oportunidad de adentrarme en el campo de la investigación.

A la MVZ Angelina Puma Iquise por compartirme sus conocimientos con paciencia y amabilidad, por apoyarme en cada tropiezo durante el desarrollo de la tesis y por todos los momentos de fraternidad dentro y fuera del laboratorio.

Al Proyecto “Rol del Antioxidante Clorhidrato de Tris (2-carboxietil) Fosfina (TCEP) en la criotolerancia de ovocitos y su potencial de desarrollo embrionario in vitro en porcino (*Sus scrofa domesticus*)” por el apoyo para el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	ix
ACRÓNIMOS.....	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. Descripción del Problema	3
1.2. Justificación	5
1.3. Objetivos.....	7
1.3.1. Objetivo general.....	7
1.3.2. Objetivos específicos	7
1.4. Hipótesis de Investigación	8
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	9
2.1. Antecedentes.....	9
2.2. Bases teóricas	15
2.2.1. Ovogénesis.....	15
2.2.2. Foliculogénesis	18

2.2.3. Maduración de ovocitos	20
2.2.4. Maduración in vitro de ovocitos.....	22
2.2.5. Clasificación de ovocitos.....	23
2.2.6. Crioconservación de ovocitos	25
2.2.7. Crioprotectores	27
2.2.8. Vitrificación.....	28
2.2.9. Estrés oxidativo.....	30
2.2.10. Antioxidantes	32
2.3. Marco conceptual	35
CAPÍTULO III:MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1. Ubicación Geográfica y Temporal.....	37
3.2. Población y Muestra	37
3.3. Materiales	38
3.4. Métodos.....	39
3.4.1. Tipo y Diseño de Investigación	39
3.4.2. Diseño Procedimental.....	40
3.4.3. Análisis de datos.....	43
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	44
4.1. Evaluación del efecto del Clorhidrato de Tris (2-Carboxietil) Fosfina (TCEP) sobre la viabilidad de ovocitos vitrificados en fase de vesícula germinal.....	44
4.2. Evaluación del efecto del Clorhidrato de Tris (2-Carboxietil) Fosfina (TCEP) sobre la maduración in vitro de ovocitos vitrificados en fase de vesícula germinal.	45

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	47
5.1. Efecto del TCEP sobre la viabilidad de ovocitos porcinos vitrificados.....	47
5.2. Efecto del TCEP sobre la maduración in vitro de ovocitos porcinos vitrificados.....	50
5.3. Contrastación de hipótesis.....	53
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES.....	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de ovocitos lecturados según tratamiento.....	37
Tabla 2. Viabilidad de ovocitos porcinos según tratamiento.....	44
Tabla 3. Fase de maduración nuclear de ovocitos porcinos según tratamiento.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de ovocitos vivos por tratamiento.....77

Figura 2. Porcentaje de ovocitos en metafase II por tratamiento.....77

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ovocitos porcinos viables y no viables. Evaluación morfológica. Microscopio invertido, magnificación 2,52x	67
Anexo 2. Ovocitos porcinos viables y no viables. Tinción con azul de tripán al 0.05%. Microscopio invertido, magnificación 2,52x.....	68
Anexo 3. Ovocitos porcinos en fase de Metafase II con el primer cuerpo polar y cromosomas teñidos (círculo rojo). Tinción Hoechst (33342). Microscopio de fluorescencia, magnificación 2,52x.....	69
Anexo 4. Datos empleados para el análisis estadístico.....	70
Anexo 5. Análisis estadístico.....	73
Anexo 6. Porcentaje de ovocitos vivos por tratamiento.....	77
Anexo 7. Porcentaje de ovocitos en metafase II por tratamiento.....	77

ACRÓNIMOS

TCEP – Clorhidrato de Tris (2-Carboxietil) Fosfina

COCs – Complejos cumulus-ovocito

Ax – Astaxantina

IGF-I – Factor de crecimiento insulínica 1

GSH – Glutación reducido

GDF – Factor de diferenciación del crecimiento

EG – Etilenglicol

DMSO – Dimetilsulfóxido

PG – Propilenglicol

AMH – Hormona antimüllerina

LH – Hormona luteinizante

FSH – Hormona foliculoestimulante

ROS – Especies reactivas a oxígeno

RNS – Especies reactivas a nitrógeno

MIV – Maduración in vitro

BSA – Albúmina sérica bovina

BM – Medio básico

PBS – Tampón fosfato salino

eCG – Gonadotrofina coriónica equina

hCG – Gonadotropina coriónica humana

RESUMEN

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. El objetivo del estudio fue determinar el efecto del antioxidante Clorhidrato de Tris (2-Carboxietil) Fosfina (TCEP) sobre la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos en fase de vesícula germinal vitrificados de porcinos. Se colectaron ovarios de 480 cerdas beneficiadas en el Camal Municipal de Tacna en el distrito de Calana. Los COCs aspirados fueron distribuidos en 3 grupos: grupo control (solo MIV), tratamiento 1 (vitrificación con 100 μ M de TCEP y MIV) y tratamiento 2 (vitrificación sin TCEP y MIV). La viabilidad de los ovocitos fue evaluada mediante análisis morfológico y la tinción azul de tripán al 0,05%, mientras que para evaluar la maduración nuclear se utilizó la tinción Hoechst (33342). Los resultados en cuanto a viabilidad fueron 94,89% de ovocitos viables para el grupo control, 48,96% para tratamiento 1 y 42,65% para tratamiento 2. Por otro lado, los resultados en cuanto a maduración in vitro fueron 31,36% de ovocitos en metafase II para el grupo control, 13,59% para tratamiento 1 y 12,49% para tratamiento 2. En ambos aspectos estadísticamente no hubo diferencia significativa entre los tratamientos. En conclusión, el TCEP no tiene un efecto sobre la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos porcinos vitrificados.

Palabras clave: clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina, maduración, ovocitos, porcinos, vitrificación

ABSTRACT

This research work was carried out in the laboratory of Animal Reproductive Biotechnology at the Agropecuary Sciences Faculty of the Jorge Basadre Grohmann National University. The objective of this study was to determine the effect of the antioxidant Tris (2-Carboxyethyl) Phosphine Hydrochloride (TCEP) on the viability and in vitro maturation of porcine oocytes vitrified at germinal vesicle stage. Ovaries were collected from 480 sows at the Municipal Slaughterhouse of Tacna in the district of Calana. The aspirated COCs were distributed in 3 groups: control group (IVM only), treatment 1 (vitrification with 100 μ M TCEP and IVM) and treatment 2 (vitrification without TCEP and IVM). Oocyte viability was assessed by morphological analysis and trypan blue stain at 0,05%, while Hoechst stain (33342) was used to assess nuclear maturation. The results for viability were 94,89% of viable oocytes in the control group, 48,96% in treatment 1 and 42,65% in treatment 2. On the other hand, the results for in vitro maturation were 31,36% of oocytes at metaphase II in the control group, 13,59% in treatment 1 and 12,49% in treatment 2. Statistically there wasn't any significant difference in both aspects between the treatments. In conclusion, TCEP has no effect on the viability and in vitro maturation of vitrified porcine oocytes.

Key words: maturation, oocytes, porcine, tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride, vitrification

INTRODUCCIÓN

La aplicación de biotecnologías reproductivas en la industria porcina es reducida por la falta de protocolos que garanticen resultados eficientes en técnicas como crioconservación y maduración *in vitro*. La implementación de la crioconservación de ovocitos facilitaría su traslado para diversificar la genética y potenciaría la investigación en el área porcina para propósitos agropecuarios y biomédicos (Chen et al., 2022). Sin embargo, esta tecnología se ve limitada por la alta sensibilidad al frío de los ovocitos porcinos que los hace más susceptibles al estrés oxidativo, el cual provoca daño en los organelos y membrana plasmática reduciendo su viabilidad y capacidad de maduración (Mateo-Otero et al., 2021).

Para mejorar la efectividad de los protocolos de vitrificación y maduración *in vitro* de ovocitos porcinos, se necesita suplementar los medios con antioxidantes para evitar el aumento de producción de radicales libres responsables del estrés oxidativo (Tatone et al., 2015), y así minimizar el daño en la estructura, mantener la funcionalidad y preservar la competencia de los ovocitos (Wu et al., 2013). Se han realizado múltiples estudios para evaluar la adición de diferentes antioxidantes en los protocolos como glicina (Tang et al., 2022), astaxantina (Xiang et al., 2021), etc., no obstante, aún no se alcanzan resultados ampliamente repetibles y significativamente efectivos.

Por tal razón se sigue investigando alternativas para mejorar dichos protocolos y conseguir mejores resultados como el clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP). Este antioxidante demostró mejorar la tasa de maduración y fertilización in vitro de los ovocitos en porcinos al reducir los niveles de radicales libres de oxígeno e incrementar los niveles de glutatión intracelular (Zeng et al., 2021). Sin embargo, no se demostró su uso durante la vitrificación de ovocitos, y debido a sus propiedades de reducción de tiol que beneficia la disminución de los niveles de radicales libres, se convierte en una alternativa para suplementar los medios utilizados durante la criopreservación de ovocitos.

En consecuencia, el presente estudio buscó determinar el efecto del TCEP sobre la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos porcinos vitrificados en fase de vesícula germinal, con el propósito de aportar una alternativa para suplementar los medios de vitrificación para mejorar la efectividad de los protocolos de crioconservación y maduración in vitro y por consecuencia facilitar la aplicación de biotecnologías reproductivas en la industria porcina.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del Problema

La crioconservación es una biotecnología reproductiva que busca preservar los recursos genéticos de animales con características deseables en bancos de genoma mediante congelación lenta o vitrificación para su futuro uso, contribuyendo a la investigación y el desarrollo de más biotecnologías como la maduración in vitro (MIV) y producción in vitro de embriones (Galeati et al., 2011).

Aún con los avances en crioconservación de semen, no se ha logrado establecer protocolos estandarizados de crioconservación de ovocitos con buenos índices de eficacia (Prentice & Anzar, 2011). Este problema persiste en los ovocitos porcinos por su alta sensibilidad a la congelación debido a la gran cantidad de lípidos en su citoplasma (Galeati et al., 2011), lo cual aumenta su susceptibilidad al estrés oxidativo y la peroxidación lipídica (Gupta et al., 2010).

El estrés oxidativo es un proceso en el cual las células presentan un exceso de radicales libres que alteran y atacan su estructura y organelos (Torres-Osorio et al., 2019); mientras que la peroxidación lipídica es el proceso resultante del estrés oxidativo mediante el cual

los radicales libres capturan electrones de lípidos para estabilizarse dañando las membranas celulares (Membrillo et al., 2003).

Ambos procesos en los ovocitos generan estrés osmótico y aumento del metabolismo oxidativo (Tatone et al., 2015) debido al incremento de radicales libres y un decrecimiento de glutatión (GSH) (Iwata et al., 2011), lo que conlleva daño en la membrana plasmática, orgánulos y lesiones en las mitocondrias con repercusión en la funcionalidad del ovocito y activación de la vía apoptótica intrínseca (Dai et al., 2015).

Como consecuencia, la competencia de desarrollo de los ovocitos porcinos es gravemente impactada (Wu et al., 2013), impidiendo alcanzar alta eficacia en la MIV de ovocitos y, por ende, mermando la producción in vitro de embriones. A través de los años, estas trabas se han superado parcialmente suplementando los medios de MIV y vitrificación con hormonas, antioxidantes, factores de crecimiento, etc.

Entre los antioxidantes utilizados se encuentran el ditioneitol (DTT) y β -mercaptoetanol, ambos reductores de tiol que contrarrestan la oxidación en los ovocitos. Getz et al. (1999) menciona que el clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), también tendría un efecto reductor de tiol y propiedades mucho más fuertes que el DTT y el β -mercaptoetanol; cualidades que también fueron observadas en

2021 por Zeng et al. al encontrar que el TCEP reduce los niveles de radicales libres responsables del estrés oxidativo.

Debido a la aún recurrente presentación del problema mencionado y a la limitada información sobre el papel del TCEP en este tema, existe la necesidad de realizar más investigaciones en esta área. Por ello el presente trabajo de investigación busca determinar el efecto del antioxidante TCEP sobre la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos vitrificados en fase de vesícula germinal de porcinos.

1.2. Justificación

El desarrollo y mejora de biotecnologías reproductivas en porcinos ha despertado el interés por ampliar los modelos porcinos con fines biomédicos y agropecuarios, sin embargo, aún no se reportan protocolos exitosos con resultados ampliamente repetibles para que tecnologías como crioconservación de gametos, MIV y producción in vitro de embriones puedan ser adoptadas por la industria porcina (Chen et al., 2022).

La crioconservación de ovocitos porcinos es una herramienta clave para la implementación de más biotecnologías, especialmente con el método de vitrificación que permite mantener los ovocitos de manera más sencilla y rápida. Sin embargo, durante el proceso de vitrificación

y calentamiento el ovocito sufre un daño considerable provocado en su mayoría por el estrés oxidativo (Somfai et al., 2007).

Las alteraciones celulares que sufren los ovocitos, debido al estrés oxidativo producto de los protocolos utilizados, conllevan a problemáticas como la limitada supervivencia de los ovocitos, insuficiente maduración citoplasmática, bajo número de blastocistos viables, dando lugar a un escaso desarrollo in vitro de embriones (Ito et al., 2020). Para evitar dichas alteraciones, se utilizan antioxidantes como crioprotectores en los medios de vitrificación y maduración.

Diferentes antioxidantes han logrado mejorar las condiciones de los ovocitos porcinos y se siguen poniendo a prueba mediante investigaciones como la glicina (Tang et al., 2022), el glutatión reducido (Pereira et al., 2019), el resveratrol (Santos et al., 2018), etc., con el fin de definir protocolos mejorados que permitan reducir el estrés oxidativo en los ovocitos y tengan resultados repetibles.

El TCEP se presenta como un antioxidante viable y muy benéfico como crioprotector para la vitrificación y MIV, puesto que presenta efectos positivos en la reducción de niveles de ROS responsables del estrés oxidativo y en el incremento de glutatión intracelular que regula los radicales libres (Zeng et al., 2021).

Apoyándose en dichas bases, este proyecto pretende profundizar en la investigación sobre el TCEP como crioprotector y evaluar su efecto sobre la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos porcinos vitrificados. Los resultados de esta investigación podrán servir como aporte y antecedentes a profesionales que quieran realizar futuras investigaciones respecto a esta línea de investigación o que deseen plantear nuevos protocolos en el área de biotecnología reproductiva.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar el efecto del antioxidante Clorhidrato De Tris (2-Carboxietil) Fosfina (TCEP) sobre la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos vitrificados en fase de vesícula germinal de porcinos.

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de Clorhidrato de Tris (2-Carboxietil) Fosfina (TCEP) sobre la viabilidad de ovocitos vitrificados en fase de vesícula germinal.
- Evaluar el efecto de Clorhidrato de Tris (2-Carboxietil) Fosfina (TCEP) sobre la maduración in vitro de ovocitos vitrificados en fase de vesícula germinal.

1.4. Hipótesis de Investigación

Ha: El TCEP tiene efecto sobre la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos vitrificados en fase de vesícula germinal.

Ho: El TCEP no tiene efecto sobre la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos vitrificados en vesícula germinal.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

El uso del antioxidante TCEP en la maduración in vitro de ovocitos ha sido poco estudiado hasta el momento, por lo cual los artículos y estudios referentes a este antioxidante son escasos. En el caso de ovocitos porcinos se puede mencionar que, en Japón en el año **2021**, **Zeng et al.** realizaron un estudio titulado “Efectos del tratamiento con clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina en la maduración in vitro de ovocitos de porcinos y la subsecuente capacidad de desarrollo de embriones fecundados in vitro” cuyo objetivo fue investigar los efectos del antioxidante TCEP en la maduración in vitro de ovocitos porcinos y en la capacidad de desarrollo de embriones fertilizados in vitro. Los resultados indicaron que el uso del tratamiento de 100µM de TCEP en los medios para MIV mejora la calidad y capacidad de desarrollo de los embriones fecundados in vitro mediante el incremento de la tasa de extrusión del primer cuerpo polar y la disminución del estrés oxidativo reflejado en la reducción significativa de especies reactivas a oxígeno y de la apoptosis de ovocitos.

En el caso del uso del TCEP específicamente en vitrificación para crioconservación de ovocitos porcinos, no se hallaron artículos o

estudios publicados referentes al tema. Sin embargo, se han realizado diversas investigaciones sobre el uso de diferentes antioxidantes en la vitrificación y maduración in vitro concretamente de ovocitos porcinos, analizando factores como concentración de diferentes crioprotectores, combinación de estos, etc. Los siguientes estudios obtuvieron distintos resultados en cuanto al efecto de los antioxidantes:

En China en el año **2022**, **Tang et al.** realizaron un estudio titulado “Glicina y melatonina mejoran el desarrollo pre-implantación de ovocitos en fase de vesícula germinal vitrificados de porcino” cuyo objetivo fue comparar los efectos de suplementar los COCs porcinos con glicina o glicina más melatonina durante la vitrificación, descongelación y subsecuente maduración para mitigar las lesiones osmóticas o daño oxidativo en el potencial de desarrollo de ovocitos porcinos. Los datos mostraron que el tratamiento con glicina aumentaba significativamente la eficiencia de vitrificación de los ovocitos porcinos hasta niveles comparables al tratamiento con glicina más melatonina, reflejado en la viabilidad de los ovocitos descongelados y su maduración nuclear. Los resultados sugieren que la mitigación del estrés oxidativo inducido por la adición de glicina y

melatonina puede mejorar aún más la competencia de desarrollo de los ovocitos vitrificados en vesícula germinal de porcinos.

En China en el año **2021**, **Xiang et al.** realizaron un estudio titulado “Rol de la astaxantina como un antioxidante eficiente en la maduración in vitro y vitrificación de ovocitos porcinos” cuyo objetivo fue comprender como la astaxantina (Ax) mejora el potencial de maduración de los ovocitos porcinos, y confirmar sus efectos citoprotectores sobre los ovocitos vitrificados durante los procesos de vitrificación y maduración in vitro. Los resultados mostraron que Ax aumentaba significativamente la tasa de supervivencia de los ovocitos vitrificados. Los ovocitos tratados con Ax mostraron una generación significativamente menor de especies reactivas del oxígeno.

En Japón en el año **2018**, **Santos et al.** realizaron un estudio titulado “El efecto del resveratrol en la capacidad de desarrollo de los ovocitos porcinos vitrificados en fase de vesícula germinal” cuyo objetivo fue investigar si el resveratrol puede mejorar la capacidad de desarrollo de ovocitos porcinos vitrificados en la fase de vesícula germinal como pretratamiento antes de la vitrificación y como tratamiento posterior al descongelamiento. El pretratamiento no afectó la supervivencia y maduración. Sin embargo, la suplementación del medio durante la posterior maduración in vitro mejoró significativamente la capacidad

de desarrollo sólo de los ovocitos supervivientes vitrificados. Durante la vitrificación el resveratrol no previno daños celulares en los ovocitos; sin embargo, en la maduración in vitro, mejoró específicamente su competencia de desarrollo.

En España en el año **2015**, **Nohalez et al.** realizaron un estudio titulado “Efectos de 2 combinaciones de crioprotectores en la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos porcinos inmaduros vitrificados” cuyo objetivo fue evaluar la eficacia de dos combinaciones de crioprotectores, etilenglicol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) y EG + propilenglicol (PG), para la vitrificación de ovocitos porcinos en fase de vesícula germinal. Las 2 combinaciones de crioprotectores aumentaron el porcentaje de ovocitos degenerados después de la maduración in vitro a comparación del grupo control. Los porcentajes de ovocitos vitrificados y descongelados vivos a las 2 horas del calentamiento fueron inferiores a los del grupo control. En ausencia de vitrificación, los efectos tóxicos de ambas combinaciones de CPA sobre los ovocitos VG fueron mínimos. Los ovocitos supervivientes fueron capaces de madurar y ser fecundados, aunque la eficiencia de la fecundación en el grupo EG + DMSO fue menor.

Aunque no se encontraron estudios publicados sobre el uso de TCEP en vitrificación y maduración in vitro de ovocitos, hay diversas

publicaciones investigando el efecto de antioxidantes con el mismo mecanismo de acción (ruptura de enlaces de disulfuro) que emplea el TCEP. Algunos de los artículos enfocados en ovocitos son:

En Indonesia en el año **2021**, **Gunawan et al.** realizaron un estudio titulado “Efecto de la adición del antioxidante glutatión dentro del medio de maduración en la morfología post-vitrificación de ovocitos de ovinos Garut” cuyo objetivo fue evaluar la adición de glutatión en la morfología del ovocito post-vitrificación. Los resultados no son significativamente diferentes entre los grupos, pero los porcentajes tienden a incrementar junto al incremento de concentración de glutatión. La adición de glutatión parece ayudar a mantener la morfología ovocitaria hasta la post-vitrificación.

En España en el año **2019**, **Pereira et al.** realizaron un estudio titulado “Suplementar el medio de maduración con factor de crecimiento insulínico 1 y la solución de vitrificación y descongelamiento con glutatión reducido mejora la tasa de supervivencia y la capacidad de desarrollo de los ovocitos madurados in vitro y vitrificados de cerdas” cuyo objetivo fue determinar si la maduración in vitro en un medio suplementado con factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-I) y la posterior vitrificación con o sin glutatión reducido (GSH) afectan a la calidad y competencia de

desarrollo. La adición de IGF-I no tuvo ningún efecto sobre la maduración, pero provocó un aumento de la tasa de supervivencia de los ovocitos vitrificados, mientras la adición de GSH a los medios de vitrificación y descongelamiento aumentó las tasas de supervivencia en el post-calentamiento. Suplementar el medio de maduración con IGF-I y las soluciones de vitrificación y descongelamiento con GSH acrecienta la calidad y criotolerancia de los ovocitos porcinos.

En Canadá en el año **2017, Moadwad et al.** realizaron un estudio titulado “Efectos beneficiosos de la suplementación con glutatión durante la vitrificación de ovocitos en fase de vesícula germinal de ratones en su desarrollo preimplantación luego de la maduración y fertilización in vitro” cuyo objetivo fue investigar los efectos de la suplementación con glutatión durante la vitrificación y calentamiento de ovocitos en VG de ratones en la preservación de la capacidad de desarrollo. La suplementación del medio de maduración con 1mM de glutatión incremento la tasa de desarrollo de blastocisto, mostrando que protege al ovocito de la pérdida de competencia de desarrollo inflingida por la congelación.

En Corea del Sur en el año **2010, Gupta et al.** realizaron un estudio titulado “Efecto de la vitrificación y el beta-mercaptoetanol en la actividad de las especies reactivas a oxígeno y el desarrollo in vitro de

ovocitos vitrificados antes o después en la fertilización in vitro” cuyo objetivo fue investigar el efecto de la vitrificación y beta-mercaptoetanol (β -Me) en la actividad de las ROS y el desarrollo in vitro de ovocitos vitrificados antes o después de la fertilización in vitro. La vitrificación aumentó la actividad de las ROS y disminuyó la viabilidad y desarrollo de los ovocitos vitrificados. La adición de β -Me al medio de vitrificación y cultivo aniquiló parcialmente la actividad de las ROS pero no mejoró la viabilidad ni la habilidad de fertilización de los ovocitos vitrificados.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Ovogénesis

La ovogénesis es un proceso largo y complicado controlado por vía neuro-hormonal mediante el cual se desarrolla el gameto femenino. Se inicia durante el período embrionario, se reanuda después de la pubertad y sigue gradualmente a lo largo de la vida reproductiva de la hembra. El proceso consta de una serie de divisiones mitóticas y meióticas cuyo propósito es recombinar y reducir el material genético del ovocito para que sea capaz de ser fertilizado. La ovogénesis está conformada por 3 fases: proliferación, crecimiento y maduración (Sequeira, 2013).

La fase proliferativa consiste en la división mitótica de las ovogonias dándose innumerables veces durante el desarrollo embrionario y fetal con la finalidad de formar un reservorio celular. En el curso de la mitosis, se aumenta el tamaño del citoplasma en la célula, se duplica el material genético que pasa a ser condensado, alineado y distribuido, y se forma el núcleo y citoplasma de la nueva célula. De cada mitosis se obtiene 2 células resultantes (ovocitos) iguales a la original por ovogonia. El final de esta fase durante el desarrollo fetal determina que las hembras nazcan con un número limitado de ovocitos que se reducirá durante otros procesos (Galina, 2021).

La fase de crecimiento comprende el aumento del tamaño ovular, la formación de la zona relucida y la multiplicación de las células epiteliales. Se subdivide en 2 etapas: la primera consta del crecimiento ovular máximo y la multiplicación epitelial mínima, mientras que la segunda consta del crecimiento ovular mínimo y la multiplicación epitelial máxima. La fase de maduración se caracteriza por la maduración nuclear y citoplásmica que sucede periódicamente después de la maduración sexual de la hembra debido a la segregación de las hormonas gonodotróficas. En el caso del núcleo se aproxima a la superficie celular, pierde su membrana y moldea el filamento de cromatina. Por otro lado, la maduración

citoplasmática no está completamente aclarada, se sabe que ocurre concisamente antes de la ovulación, cambiando el metabolismo de las células de granulosa y la composición del líquido folicular (Sequeira, 2013).

Durante estas 2 últimas fases, los ovocitos pasan parte de la división meiótica. La meiosis está formada por 2 segmentos: meiosis I y meiosis II. En el transcurso de la meiosis I, el material genético del ovocito se recombina en la subetapa de profase, dando como resultado una célula diploide y un primer cuerpo polar. Durante la meiosis II, el ovocito resultante de la meiosis I reduce a la mitad su material genético, dando como resultado una célula haploide y un segundo cuerpo polar; esta parte del proceso ocurre durante la fertilización. Durante esta división meiótica ocurren 2 pausas: la primera sucede en la profase de la meiosis I y termina con el inicio de la pubertad, su reanudación se ve marcada por la ruptura de la vesícula germinal mediante la cual el material genético se libera para ser anclado, alineado y distribuido, la segunda pausa sucede en la metafase de la meiosis II después de la ovulación y termina con la fertilización, reiniciándose la meiosis cuando el espermatozoide reactiva al ovocito (Galina, 2021).

2.2.2. *Foliculogénesis*

El folículo se define como el compartimiento del ovario mediante el cual realiza su función de gametogénesis y esteroidogénesis. La mayoría de folículos primordiales, los cuales se forman junto a las ovogonias durante la vida fetal, empiezan a crecer continuamente durante toda la vida reproductiva de las hembras o hasta que se agoten las reservas. Al salir el folículo de la reserva, éste continúa creciendo hasta la ovulación o que se degenere; el folículo que alcanza el mayor tamaño se encarga de la mayor parte de la secreción de estrógeno durante el estro. En las cerdas, se incorpora folículos ovulatorios a la población ovulatoria continuamente durante la fase folicular, ya que el desarrollo de los folículos pequeños es promovido por los folículos dominantes (Hafez & Hafez, 2002).

El proceso de foliculogénesis consiste en la formación de los folículos primordiales y su consecuente crecimiento a las etapas sucesivas. El crecimiento y maduración folicular comprende una secuencia de transformaciones subcelulares y moleculares de sus diversos componentes regidos por factores intraováricos e intrafoliculares y señales hormonales (Hafez & Hafez, 2002). En cada etapa se va adicionando un componente diferente: el folículo primordial está constituido por el ovocito y una capa de células planas de la

granulosa; el folículo primario está conformado por el ovocito y varias capas de células cuboides de la granulosa; el folículo secundario está constituido por el folículo primario al que se le adiciona las células de la teca; el folículo terciario está conformado por el folículo secundario en el cual se forma el antro folicular con líquido secretado por las células de la granulosa; y por último el folículo preovulatorio o de Graff está constituido por el folículo terciario con receptores de hormona luteinizante en las células de la granulosa (Galina, 2021).

Dicho proceso se divide en 2 etapas: la etapa basal y la etapa tónica. En la etapa basal o independiente de gonadotropinas, el ovocito promueve el crecimiento de folículo primordial a primario. El ovocito forma uniones GAP que conectan el citoplasma del ovocito con el citoplasma de las células del cumulus para permitir el intercambio directo de factores de crecimiento como el factor de diferenciación del crecimiento (GDF), hormona antimüllerina (AMH), etc. El ovocito comienza a producir GDF en las células de la granulosa promoviendo el crecimiento folicular y la diferenciación de las células de la granulosa y las células del cumulus; esta transición también puede ser regulada por folículos más desarrollados que al producir AMH afecta negativamente al ovocito y mantiene detenido al folículo primordial. La etapa tónica o dependiente de gonadotropinas se

encarga del desarrollo desde folículo primario a preovulatorio. Debido a la diferenciación de las células de la granulosa y teca, los folículos aumentan su capacidad de producir estradiol y de reaccionar a gonadotropinas. El ovocito necesita un adecuado nivel de maduración y una correcta secreción de gonadotropinas para regular su función dentro del folículo. El antígeno nuclear de células de proliferación (PCNA) es una proteína presente en el folículo en esta etapa que se encarga de fomentar la proliferación de células del cumulus y granulosa. Otra proteína importante en esta etapa es el factor de crecimiento de endotelio vascular, responsable de fomentar la vascularización de las células de la teca. El estradiol determina el folículo que obtendrá los receptores de LH para llegar al estado de folículo preovulatorio (Galina, 2021).

2.2.3. *Maduración de ovocitos*

La ovogénesis cuenta con 3 fases: proliferación, crecimiento y maduración del ovocito. Este complejo proceso sólo finalizará cuando un ovocito resultante del crecimiento reanude la meiosis, completando así la primera división meiótica para producir un ovocito secundario con el primer cuerpo polar y pasando por la segunda división meiótica para producir un óvulo con un segundo cuerpo polar, ambos procesos correspondientes a la fase de maduración. A lo largo de la vida de la

hembra, menos del 0,1% de los ovocitos primarios termina el proceso de ovogénesis puesto que sólo puede ser completado por ovocitos en folículos primordiales que alcancen sus diversas etapas de desarrollo en momentos precisos con las condiciones óptimas de oxigenación, nutrición, vascularización y exposición a factores paracrinos y hormonales (Boeta et al., 2018).

Dicha fase de maduración comprende 2 acontecimientos importantes: la preparación nuclear y la preparación citoplásmica. La preparación nuclear inicia con los ovocitos en reposo los cuales presentan un gran núcleo conocido como vesícula germinal. La meiosis se reinicia gracias a la oleada de gonadotropina y avanza desde el estado de vesícula germinal hasta la metafase de la segunda meiosis, expulsando el primer cuerpo polar al espacio perivitelino y pausándose nuevamente el proceso. La preparación citoplásmica ocurre con el reinicio de la meiosis que elimina el efecto inhibitor de las células foliculares sobre el ovocito, provocando la pérdida de las células de la granulosa y otras que lo rodean. Ambos acontecimientos son independientes de la naturaleza de la estimulación folicular, el diámetro del folículo del que se origina y la fuente o filtrado del líquido folicular (Hafez & Hafez, 2002).

2.2.4. *Maduración in vitro de ovocitos*

El primer paso de esta técnica es la selección de complejos cumulus-ovocito (COC). Los métodos para la selección suelen basarse en diversos parámetros como morfología del cumulus, tamaño del folículo, tamaño del ovocito, etc. Los COC deseables a seleccionar son aquellos con aspecto uniforme y masa cumular compacta y completa pues presentan mayor capacidad de desarrollo. En cuanto a los ovocitos, se espera que los más capaces de desarrollarse posean un citoplasma uniforme, liso y finamente granulado, rodeado de 3 capas de células del cumulus como mínimo. En los últimos años se ha intentado mantener los ovocitos en estadio de vesícula germinal antes del proceso de maduración in vitro para que adquieran competencia de desarrollo durante la pausa en la meiosis (Gordon, 2004).

La maduración se realiza en grupos considerando el volumen de la gota con la cantidad de ovocitos a madurar. En diversos laboratorios se emplea protocolos de maduración que consisten en el uso de medios como TCM-199 suplementado con suero fetal bovino y gonadotropinas (LH y FSH) en un 5% de dióxido de carbono en aire a 38,5°C. En casos en los que las hembras donantes se encuentren lejos del laboratorio, puede iniciarse el proceso durante el transporte

utilizando incubadoras portátiles a baterías. Tras 24 horas de la incubación, el ovocito ha madurado, expulsado el primer cuerpo polar y está listo para la fecundación. En condiciones óptimas se espera que más del 90% de los ovocitos alcancen la metafase de la segunda meiosis (Gordon, 2004). Durante el proceso de maduración in vitro ocurren cambios moleculares a nivel del ADN y cambios globales que preparan al ovocito para proveer los sustratos y maquinaria para la síntesis de proteínas de los primeros estadios embrionarios. Se debe tener en consideración los efectos paracrinos de los COC que puedan afectar la maduración; por lo cual, el parámetro para estimar la finalización de la maduración es la evaluación de la expansión de las células del cumulus (Galina, 2021).

2.2.5. *Clasificación de ovocitos*

Previo a los protocolos de maduración in vitro se puede evaluar la calidad de los ovocitos, puesto que es un factor significativamente influyente para el posterior desarrollo embrionario. Para dicha evaluación se usan métodos no invasivos que valoran la estructura del COC, el citoplasma ovocitario, la zona pelúcida, el cuerpo polar, entre otros. Basándose en dichos parámetros, la calidad del ovocito se puede clasificar en 4 grados: el grado 1 corresponde a ovocitos redondos con un primer cuerpo polar liso, gránulos citoplasmáticos

dispersos y un espacio perivitelino normal cuya parte más ancha equivalente al diámetro del cuerpo polar; el grado 2 corresponde a ovocitos con morfología similar pero con gránulos ligeramente centralizados; el grado 3 corresponde a ovocitos redondos con un primer cuerpo polar poco visible o degenerado, gránulos muy centralizados y un espacio vitelino cuya parte más ancha es mucho menor al diámetro de un cuerpo polar normal; y el grado 4 corresponde a ovocitos con morfología anormal, granos dispersos, cuerpo polar anormal y un espacio vitelino mucho mayor que el diámetro de un cuerpo polar normal, pudiendo los ovocitos vagar en dicho espacio (Lasiene et al., 2011).

Posterior al protocolo de maduración se puede evaluar la proliferación de células del cumulus y su grado de expansión como indicador de una maduración correcta. Para evaluar el grado de expansión, se emplea una clasificación según la cantidad de capas de células del cumulus alrededor del ovocito. Se denomina ovocito desnudo a aquel sin células del cumulus, se clasifica como grado I a los ovocitos con una a 3 capas, como grado II a los ovocitos con 3 a 5 capas y como grado III a los ovocitos con más de 5 capas. Se considera al grado III como indicador de maduración del ovocito (Galina, 2021).

2.2.6. *Crioconservación de ovocitos*

La técnica de criopreservación consiste en la conservación de células o tejidos enteros mediante la exposición a temperaturas bajo cero en nitrógeno líquido (-196 °C). A una temperatura tan baja, la actividad biológica se detiene de forma efectiva y el estado funcional de las células puede conservarse durante siglos (Prentice & Anzar, 2011). Es una herramienta importante para preservar células germinales para usos posteriores como la fecundación, como citoplastos para la transferencia nuclear de células somáticas y también para bancos de genomas de pacientes y especies animales valiosas. Aunque la optimización de los procedimientos de congelación ha dado lugar a mejoras en la calidad de los ovocitos, se ha probado que estructuras como la membrana plasmática y el citoesqueleto son muy sensibles a las criolesiones, lo que con frecuencia provoca la disrupción celular y la muerte celular. Factores como la maduración del ovocito, los tipos de crioprotectores utilizados y las técnicas empleadas influyen en el resultado del procedimiento (Tharasanit & Thuwanut, 2021).

El alcance de las criolesiones en las células depende de características como tamaño y forma celular, permeabilidad de membranas y calidad del ovocito. La capacidad de mantener el desarrollo embrionario luego de la crioconservación es baja, esto

puede deberse a la susceptibilidad de los ovocitos a sufrir daño durante el enfriamiento y/o congelación y subsecuente descongelación. Además, la velocidad de enfriamiento y el método de congelación también son factores importantes a tener en cuenta para prevenir las criolesiones de las células (Prentice & Anzar, 2011).

Las técnicas de crioconservación de ovocitos se clasifican generalmente en congelación lenta a velocidad controlada y vitrificación "sin hielo". La congelación lenta convencional requiere un congelador programable que pueda controlar sustancialmente la velocidad de congelación óptima. Durante el enfriamiento, la temperatura desciende gradualmente por debajo del punto de congelación, donde se forma el hielo. Sin embargo, la formación de hielo se produce en las regiones extracelular e intracelular. La formación excesiva de hielo intracelular altera la estructura y la función celular, lo que provoca la apoptosis o muerte celular. Por lo tanto, la velocidad de congelación óptima es el proceso lento que logra un equilibrio entre una deshidratación celular adecuada y una formación mínima de hielo intracelular. La vitrificación es un proceso en el cual la célula y su entorno se solidifican de manera semejante al vidrio por elevación de su viscosidad impidiendo que se formen cristales de hielo (Tharasanit & Thuwanut, 2021).

2.2.7. *Crioprotectores*

Se definen como sustancias químicas utilizadas para proteger a las células de las criolesiones durante el proceso de crioconservación. La acción de estas sustancias crioprotectoras varían según el tipo de crioprotector utilizado, tipo de células, factores térmicos, entre otros; sin embargo, la mayoría de ellos limitan la cantidad de agua intracelular y extracelular evitando que se convierta en hielo durante la etapa enfriamiento. Los crioprotectores suelen utilizarse en medios tamponados con un pH estable entre 7,2 y 7,4 (Prentice & Anzar, 2011).

Pueden clasificarse en 2 grupos según su capacidad de permeabilidad de la membrana celular: penetrantes y no penetrantes.

a) Los crioprotectores penetrantes o permeantes.

Son compuestos orgánicos que penetran la membrana plasmática celular pasivamente, sustituye el agua en el fluido intracelular e interfiere en sus enlaces de hidrógeno logrando reducir la formación de hielo. A su vez ayuda a aumentar la hidratación de las células durante el enfriamiento para evitar la acumulación excesiva de electrolitos. Algunos crioprotectores de este grupo son el glicerol, el etilenglicol, el propilenglicol, el dimetilsulfóxido, el metanol y el butanodiol (Tharasanit & Thuwanut, 2021).

b) Los crioprotectores no penetrantes o no permeantes.

Son compuestos de peso molecular elevado y alta hidrofilia, estos actúan extrayendo el agua libre de la célula por osmosis y provocando deshidratación intracelular. Se utilizan con el objetivo de estabilizar las estructuras de la membrana y reducir la toxicidad provocada por la concentración de los mismos crioprotectores. Algunos crioprotectores en este grupo son la polivinilpirrolidona, el polietilenglicol y los azúcares como la sacarosa, la trehalosa, la glucosa y la fructosa (Prentice & Anzar, 2011).

Para una mayor protección contra las criolesiones se suele utilizar una combinación de crioprotectores de ambos grupos durante la crioconservación (Tharasanit & Thuwanut, 2021).

2.2.8. *Vitrificación*

Se define como la solidificación vítrea de soluciones acuosas a bajas temperaturas lo cual evita la cristalización del hielo durante el enfriamiento y calentamiento gracias a la viscosidad de los crioprotectores utilizados. El crioprotector más comúnmente aceptado para los ovocitos es el etilenglicol debido a su bajo peso molecular y baja toxicidad; por otro lado, los aditivos con grandes pesos moleculares pueden reducir la cantidad de crioprotectores necesarios

para lograr una vitrificación satisfactoria y actuar como un tampón osmótico para evitar el choque posterior al crioalmacenamiento (Koutlaki et al., 2006).

Esta técnica utiliza elevadas concentraciones de crioprotectores de 7-8M en volumen mínimo a la par de altas velocidades de enfriamiento entre 15 a 30°C por minuto, lo que evita la formación de cristales de hielo durante los procesos de congelación-descongelación, propiciando una mejor conservación de la estructura y un daño menor en la fisiología del ovocito. Posterior a ello se sumerge los ovocitos bruscamente en nitrógeno líquido para solidificarlos para que el agua intracelular no tenga tiempo de formar cristales y dañar los organelos (García et al., 2011). La velocidad de enfriamiento debe ser extremadamente rápida para generar los menores daños fisiológicos, puesto que la exposición a las altas concentraciones de crioprotectores son tóxicas para la célula; por ello los ovocitos solo pueden exponerse por menos de un minuto al volumen mínimo del medio de vitrificación. Esto ha puesto a la vitrificación como una alternativa altamente competitiva a la técnica de congelación convencional (Prentice & Anzar, 2011).

2.2.9. *Estrés oxidativo*

Generalmente las sustancias químicas poseen electrones con carga negativa desplazándose en pares en la órbita alrededor de su núcleo, sin embargo, en los últimos años se han determinado especies que presentan uno o más electrones que se desplazan de manera impar lo que provoca inestabilidad del equilibrio molecular (Viada et al., 2017). A dichas sustancias se les denomina radicales libres, estas moléculas tienen un carácter paramagnético que las torna muy inestables y reactivas siendo capaces de combinarse con diferentes moléculas que integran la estructura celular y sus derivados e incluso atacándolas. Estos radicales dentro de los sistemas biológicos están representados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y por las especies reactivas de nitrógeno (RNS) principalmente (Corrales & Muñoz, 2012).

En condiciones fisiológicas normales, el metabolismo aeróbico se vincula con la producción de ROS como el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y el radical hidroxilo, mientras que las RNS como el óxido nítrico se forman en la conversión de L-arginina a L-citrulina. Sin embargo, cuando se presenta una excesiva producción de estos radicales por encima de los niveles fisiológicos u ocurre un defecto en la eliminación efectiva de estos llegando a exceder la defensa

antioxidante de las células, da lugar a un proceso llamado estrés oxidativo. El estrés oxidativo producido en las células genera daño en las biomoléculas como los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, induciendo alteraciones en su estructura y fisiología; a su vez afecta la cadena respiratoria mitocondrial alterando la función de muchas enzimas metabólicas (Torres-Osorio et al., 2019).

Definido químicamente, el estrés oxidativo es un incremento del decrecimiento del potencial celular. Los efectos de este proceso dependen de la magnitud de los daños y la capacidad de la célula de sobrellevarlos y recuperar su condición inicial. Si el estrés oxidativo es severo causaría muerte celular, si este es moderado desencadenará apoptosis, pero si es muy intenso puede llegar a ocasionar necrosis (Viada et al., 2017).

Los radicales libres tienen una vida muy efímera, su actividad destructora y agresividad suceden en fracciones de milésimas de segundo en los cuales consiguen el electrón complementario faltante y estabilizan su carga eléctrica dejando de ser radicales libres (Viada et al., 2017). Mantener bajo control los niveles de especies reactivas permite que lleguen a ser beneficiosas en los procesos celulares (Corrales & Muñoz, 2012).

2.2.10. *Antioxidantes*

Desde el campo biológico, se define como un agente reductor potente que previene el consumo de oxígeno al disminuir o evitar la oxidación de los sustratos, cumple un papel crucial en la bioquímica de los organismos vivos al depurar las ROS antes de que produzcan daños en las células. Estos pueden clasificarse en 2 amplios grupos: hidrofílicos o solubles en agua e hidrofóbicos o solubles en lípidos. Los antioxidantes hidrofílicos reaccionan en el citoplasma celular y plasma sanguíneo, en cambio los antioxidantes hidrofóbicos protegen las membranas celulares. Ambos grupos se encuentran en amplia gama en fluidos corporales y tejidos (Viada et al., 2017).

Existen sistemas antioxidantes endógenos y exógenos que limitan la actividad y producción de ROS, formando en conjunto un sistema efectivo de defensa. Los mecanismos antioxidantes pueden ser mediados por proteínas de unión como la transferrina, ferritina y albúmina; por moléculas procedentes de alimentos como la vitamina A, C y E; por enzimas como el superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa; por moléculas hidrofílicas como el ascorbato, urato y glutatión reducido; por moléculas lipofílicas como tocoferoles, flavonoides, carotenoides y ubiquinol; y por algunos metales como zinc, cobre y selenio (Torres-Osorio et al., 2019).

Dentro de los antioxidantes usados para suplementar los medios de cultivo para ovocitos están la vitamina C y el alfa tocoferol. La vitamina C reduce la fabricación de ROS en los ovocitos aumentando su capacidad para el desarrollo embrionario, mientras que el alfa tocoferol afecta beneficiosamente a la tasa de blastocitos y su celularidad (Torres-Osorio et al., 2019).

El uso de antioxidantes como glutatión reducido, resveratrol, vitamina C o beta-mercaptoetanol en el medio de cultivo es altamente beneficioso para los ovocitos de porcinos, cada uno aportando efectos ventajosos diferentes. El uso de glutatión reducido acrecenta la calidad y criotolerancia de los ovocitos porcinos sometidos a maduración in vitro mediante rutas de señalización antiapoptóticas y de choque térmico. El uso de resveratrol disminuye la producción de ROS mitocondriales y regula la expresión de enzimas y cofactores antioxidantes, a su vez mejora la supervivencia y capacidad de desarrollo de los ovocitos de porcinos durante la vitrificación y el calentamiento post-vitrificación. El uso de vitamina C reduce la producción intracelular de ROS durante el proceso de vitrificación, lo cual aumenta la supervivencia y calidad de los futuros embriones. El uso de beta-mercaptoetanol disminuye los niveles de ROS y mejora

la capacidad de desarrollo post-fertilización de los ovocitos vitrificados de porcinos (Mateo-Otero et al., 2021).

El clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina, también conocido por sus siglas en inglés TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine), es una sustancia reductora usada comúnmente en biología molecular y bioquímica de proteínas siendo efectivo para desintegrar los puentes de disulfuro, lo cual provoca la desnaturalización de proteínas. Dentro del campo de investigación suele emplearse para almacenar proteínas a largo plazo y preparar muestras para pruebas como electroforesis, cromatografía, entre otros. El TCEP es un agente estable en soluciones acuosas, capaz de sintetizarse en grandes cantidades, altamente reactivo y selectivo (Kroemer, 2021).

Este agente es reductor de tioles como el ditioneol y el beta-mercaptoetanol, compuestos ya utilizados como antioxidantes en el procedimiento de maduración in vitro por su capacidad de contrarrestar la oxidación en ovocitos maduros, mejorar la posterior fertilización y aumentar su capacidad de desarrollo. A diferencia de estos 2 antioxidantes, el TCEP tiene un poder reductor mucho más fuerte, un olor más neutral, mayor resistencia a la oxidación por aire y un amplio rango de pH (1,5-8,5) que le confiere una mayor estabilidad ante pH superior al biológico. Aunque se ha utilizado

experimentalmente en los medios de cultivo para maduración in vitro, aún no están claros los efectos de este nuevo potencial antioxidante sobre el estado del ovocito y sus propiedades (Zeng et al., 2021).

2.3. Marco conceptual

2.3.1. *Antioxidante*: Sustancia reductora potente que disminuye o evita la oxidación de los sustratos al prevenir el consumo de oxígeno (Torres-Osorio et al., 2019).

2.3.2. *Crioprotector*: Sustancia química utilizada durante la crioconservación celular para proteger de criolesiones al limitar la cantidad de agua intracelular (Tharasanit & Thuwanut, 2021).

2.3.3. *Estrés oxidativo*: Mayor reducción del potencial celular generado por el exceso de radicales libres en las células los cuales producen daño en las mitocondrias y biomoléculas (Torres-Osorio et al., 2019).

- 2.3.4. *Maduración in vitro*: Proceso que consiste en colocar ovocitos inmaduros obtenidos de folículos ováricos antrales en medios de cultivo bajo condiciones de laboratorio para conseguir ovocitos en metafase II, es decir, que hayan terminado su maduración nuclear (Vargas et al., 2012).
- 2.3.5. *Ovocito*: Células germinativas femeninas derivadas de las ovogonias luego del proceso de meiosis; forma primaria del óvulo (Descriptores en Ciencias de la Salud, 2011).
- 2.3.6. *Vesícula germinal*: Estado inmaduro del ovocito caracterizado por la presencia del pronúcleo condensado que contiene todo el material genético (Hafez & Hafez, 2000).
- 2.3.7. *Viabilidad*: Capacidad celular para ejecutar procesos fisiológicos y bioquímicos necesarios para su supervivencia bajo ciertas condiciones (Breeuwer & Abee, 2000).
- 2.3.8. *Vitrificación*: Método de crioconservación celular mediante solidificación ultrarrápida de soluciones a bajas temperaturas con efecto similar al vidrio, sin formación de cristales de hielo intracelular (Prentice & Anzar, 2011).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación Geográfica y Temporal

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, ubicado en la coordenada UTM 366907 8006025 (Zona 19K) a 599 msnm, en la provincia y distrito de Tacna en el sur del Perú; donde la temperatura varía en un rango de 22-30 °C en verano y 10-24 °C en invierno.

3.2. Población y Muestra

Se trabajo con una muestra de 30 cerdas (60 ovarios) por repetición, dando una muestra total de 480 cerdas. Se lecturaron en total 1 280 ovocitos distribuidos en 2 tratamientos y un control.

Tabla 1.

Número de ovocitos lecturados según tratamiento

	Tratamiento		
	Control	T1 (con TCEP)	T2 (sin TCEP)
Viabilidad	350	426	504
Maduración in vitro	176	187	187

3.3. Materiales

3.3.1. Material de laboratorio

- ✓ Agujas N°21
- ✓ Jeringas de 10 ml
- ✓ Placas Petri
- ✓ Dispositivo OPS
- ✓ Tips de 10 µl
- ✓ Tips de 100 a 200 µl
- ✓ Placas de 4 pocillos
- ✓ Nitrógeno líquido

3.3.2. Equipo de laboratorio

- ✓ Microscopio invertido
- ✓ Microscopio de fluorescencia
- ✓ Estereomicroscopio
- ✓ Baño María
- ✓ Platina térmica
- ✓ Cabina de flujo laminar vertical
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Refrigeradora
- ✓ Medidor de pH de mesa

3.3.3. *Reactivos*

- ✓ TCM-199
- ✓ Etilinglicol
- ✓ Dimetil sulfoxido
- ✓ Sucrosa
- ✓ Trehalosa
- ✓ Azul de tripan
- ✓ Bisbenzimidida
- ✓ Ioduro de propidio
- ✓ Clorhidrato De Tris (2-Carboxietil) Fosfina (TCEP)
- ✓ PBS
- ✓ BSA
- ✓ Suero fetal bovino
- ✓ Antibiótico

3.4. Métodos

3.4.1. Tipo y Diseño de Investigación

Este trabajo es de tipo experimental y el diseño aplicado es completamente al azar (DCA), trabajando con 2 tratamientos y un control.

3.4.2. *Diseño Procedimental*

- Recuperación de COCs de ovarios obtenidos post mortem

Los ovarios fueron diseccionados del aparato reproductor y colocados en un termo con solución fisiológica temperada 25°C a 30°C, se transportaron al laboratorio y fueron lavados con solución fisiológica a temperatura 37°C. Los COCs fueron recuperados por punción de folículos antrales de 3 a 5 mm con una jeringa de 10 ml y aguja N° 21. Después los COCs obtenidos se observaron en el microscopio invertido y se clasificaron según el aspecto del citoplasma y las células que los rodean en las siguientes categorías: A (más de 3 capas compactas de células del cumulus y citoplasma homogéneo), B (2-3 capas de compactas de células del cumulus y citoplasma homogéneo), C (1-2 capas continuas de células del cumulus) y D (células del cumulus expandidas o no presentes y citoplasma irregular). Se trabajó solo con COCs de clasificación A, B y C.

- Vitrificación de ovocitos

Los ovocitos recuperados se colocaron en un medio básico (BM) que consistió en NCSU-37 sin glucosa, suplementado con HEPES 20 mM, TCEP 100 µM, piruvato de sodio 0,17 mM y lactato de sodio 2,73 mM. Para el grupo control no se adicionó el TCEP 100

μM . El medio BM se complementará adicionalmente con 4 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA; Fracción V) durante los primeros 30 minutos de tratamiento antes del medio de equilibrio.

Luego, los COCs fueron tratados en el medio de equilibrio, compuesto por el medio básico suplementado con 2% (v/v) de etilenglicol (EG, E-9129), 2% (v/v) de propilenglicol (PG) y 4 mg/ml de BSA. Los COCs fueron incubados en el medio de equilibrio durante 13 o 15 min a 38,5 °C, fueron lavados tres veces en gotas de 20 μl de solución de vitrificación (BM suplementada con 50 mg/ml, polivinilpirrolidona, trehalosa 0,3 M, EG al 17,5 %, PG al 17,5 %) a 38,5 °C, luego fueron pipeteados en un dispositivo de OPS en grupos de 25 a 30 COCs aproximadamente en 2 o 3 μl de solución de vitrificación y finalmente se sumergieron en nitrógeno líquido.

- Desvitrificación de los ovocitos

El medio de calentamiento estuvo compuesto por el medio BM suplementado con y sin TCEP 100 μM , trehalosa al 0,2, 0,1 o 0,05 M a 38,0 °C, los ovocitos fueron transferidos consecutivamente durante períodos de 1 min (cada uno). Luego se lavaron en medio BM sin trehalosa a 38,0 °C y fueron puestos a maduración in vitro.

- Evaluación de la viabilidad de los ovocitos vitrificados-descongelados

Los ovocitos descongelados fueron evaluados mediante tinción con azul tripán al 0,05%:

- Los ovocitos fueron colocados en una placa Petri con 80 µl de medio de PBS y se lavaron 2 veces.
- Luego fueron colocados en gotas de azul de tripán al 0,05% por 10 minutos.
- Finalmente se realizó un lavado en gotas de medio de manipulación y se evaluó la viabilidad y morfología en el microscopio invertido. Los ovocitos viables no presentaron pigmentación azul y los no viables se pigmentaron de azul.

- Maduración in vitro

El medio de maduración estuvo compuesto por TCM-199 suplementado con 0,91 mM piruvato de sodio, 0,57 mM clorhidrato de cisteína, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 10 UI/ml de eCG, 10 UI/ml de hCG, 100 mg/ml de sulfato de amikacina, 1 µg/ml de 17β-estradiol y líquido folicular de porcino al 10%. Los ovocitos fueron colocados en placas de 4 pocillos con 500 µl del medio de maduración por un periodo de 44 horas.

- Evaluación de maduración nuclear in vitro

Los ovocitos madurados por 44 horas fueron fijados, teñidos con Hoechst (33342) y observados en un microscopio de fluorescencia donde fueron clasificados según la configuración de su cromatina en las categorías: vesícula germinal (VG), metafase I (MI), anafase (A), metafase II (MII) y degenerados (D).

3.4.3. Análisis de datos

Para analizar los datos de los 2 tratamientos y el grupo control se determinó la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de variancias mediante la prueba de Levene. Para todos los análisis se empleó un nivel de significancia del 95%. En el caso de los datos sobre viabilidad, todos siguieron los supuestos de normalidad y homogeneidad por lo cual se utilizó análisis de varianza (ANOVA) para contrastar los tratamientos y la prueba LSD para comparar los promedios. En el caso de los datos sobre maduración in vitro, los datos de las categorías VG, MI, A y D no siguieron los supuestos de normalidad y homogeneidad por lo cual se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para comparar los tratamientos. En cambio, los datos de la categoría MII sí siguieron dichos supuestos por lo tanto se contrastó los tratamientos con ANOVA y se realizó la comparación de promedios con la prueba LSD.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS

4.1. Evaluación del efecto del Clorhidrato de Tris (2-Carboxietil) Fosfina (TCEP) sobre la viabilidad de ovocitos vitrificados en fase de vesícula germinal.

Tabla 2. *Viabilidad de ovocitos porcinos según tratamiento*

	N° de ovocitos	Viabilidad de ovocitos			
		Ovocitos viables (%)		Ovocitos no viables (%)	
Control	350	331	(94,89 ±0,62)	19	(5,11 ±2,60)
T1	426	188	(48,96 ±1,08)	238	(51,04 ±1,08)
T2	504	189	(42,65 ±8,59)	315	(57,35 ±8,59)

T1 = Tratamiento con TCEP; T2 = Tratamiento sin TCEP

En la tabla 2, se observa los resultados en cuanto a viabilidad de ovocitos porcinos vitrificados en fase de vesícula germinal de los 2 tratamientos (T1 con TCEP y T2 sin TCEP) y el grupo control. De los 350 ovocitos letrados dentro del grupo control se obtuvo un 94,89% de ovocitos viables y 5,11% de ovocitos no viables. En el caso de los tratamientos, de los 426 ovocitos letrados dentro del T1 se obtuvo un 48,96% de ovocitos viables y 51,04% de ovocitos no viables, mientras que de los 504 ovocitos letrados dentro del T2 se obtuvo un 42,65%

de ovocitos viables y 57,35% de ovocitos no viables. Al análisis estadístico de la viabilidad determinada por el porcentaje de ovocitos viables, se encontró que el grupo control tuvo un resultado notablemente mayor a comparación de los tratamientos T1 y T2, los cuales no presentaron diferencia significativa entre sí ($p>0,05$).

4.2. Evaluación del efecto del Clorhidrato de Tris (2-Carboxietil) Fosfina (TCEP) sobre la maduración in vitro de ovocitos vitrificados en fase de vesícula germinal.

Tabla 3. Fase de maduración nuclear de ovocitos porcinos según tratamiento

	N° de ovocitos	Fase de maduración nuclear de ovocitos				
		VG (%)	MI (%)	A (%)	MII (%)	D (%)
Control	176	35 (29,15 ±0,78)	45 (23,36 ±1,05)	3 (1,51 ±0,27)	64 (31,36 ±1,70)	29 (14,62 ±1,55)
T1	187	53 (30,52 ±0,64)	80 (39,77 ±0,76)	0	27 (13,59 ±0,37)	27 (16,12 ±0,58)
T2	187	60 (31,98 ±0,71)	61 (28,61 ±0,51)	0	28 (12,49 ±0,52)	38 (26,92 ±0,69)

VG = Vesícula germinal; MI = Metafase I; A = Anafase; MII = Metafase II; D = Degenerado

T1 = Tratamiento con TCEP; T2 = Tratamiento sin TCEP

En la tabla 3, se presentan los resultados de la tasa de maduración nuclear de ovocitos porcinos vitrificados en fase de vesícula germinal de los 2 tratamientos (T1 con TCEP y T2 sin TCEP) y el grupo control. En el grupo control se leyó 176 ovocitos de los cuales se observó un 29,15% en fase de vesícula germinal, 23,26% en metafase I y 31,36% en metafase II. En el tratamiento T1 se leyó 187 ovocitos de los cuales se observó un 30,52% en fase de vesícula germinal, 39,77% en metafase I y 13,59% en metafase II. En el tratamiento T2 se leyó 187 ovocitos de los cuales se observó un 31,98% en fase de vesícula germinal, 28,61% en metafase I y 12,49% en metafase II. Al análisis estadístico de la tasa de maduración nuclear, determinada por el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la metafase II, se encontró que el grupo control tuvo una diferencia considerable al compararlo con los tratamientos, de igual manera T1 y T2 obtuvieron resultados similares entre sí ($p > 0,05$).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1. Efecto del TCEP sobre la viabilidad de ovocitos porcinos vitrificados

En este estudio se obtuvo un 48,96% de viabilidad usando el antioxidante TCEP como crioprotector en la vitrificación de ovocitos porcinos, pero mostró que no hay diferencia significativa con el resultado de la vitrificación sin TCEP que obtuvo 42,65% ovocitos viables. No se han reportado trabajos equiparables sobre el uso del TCEP en vitrificación de ovocitos, sin embargo, existen investigaciones realizadas con antioxidantes con el mismo mecanismo de acción que pueden utilizarse como punto de referencia.

Moadwad et al. (2017) obtuvieron resultados proporcionalmente parecidos al suplementar con glutatión medios para ovocitos de ratones y no encontraron diferencia significativa entre la viabilidad del grupo suplementado y el grupo control (95% y 89,9% respectivamente). De la misma manera Gupta et al. (2010) tuvieron resultados similares agregando beta-mercaptoetanol en el medio de vitrificación de ovocitos porcinos sin encontrar diferencia significativa con el tratamiento control (74,49% y 75% respectivamente). Esto refleja que el TCEP, a pesar de no mostrar diferencia significativa entre tratamientos, podría tener

efecto sobre la viabilidad de los ovocitos semejante al de otros crioprotectores ya utilizados en crioconservación y en constante estudio, siendo necesario ampliar las investigaciones y contemplar más factores como concentración, dispositivos para vitrificación, etc.

En cambio, los resultados de este estudio difieren con los obtenidos por Gunawan et al. (2021) que reportaron 71,88% de viabilidad al suplementar los medios de vitrificación para ovocitos ovinos con glutatión mostrando una diferencia significativa con el tratamiento control que obtuvo 56,25% de viabilidad. Resultados similares a esto reportaron Pereira et al. (2019) que obtuvieron 49% de viabilidad adicionando glutatión al medio de vitrificación de ovocitos porcinos, un resultado significativamente mayor al 39% de viabilidad obtenido por el tratamiento control.

Estas diferencias pueden deberse a una limitada actividad del TCEP en los ovocitos a causa de su proceso de reducción. El mecanismo reductor de este antioxidante consiste en el intercambio con los átomos de azufre de los enlaces disulfuros creados por los radicales libres (Terrill et al., 2013). La reacción implica un ataque nucleofílico del fósforo a los azufres de los enlaces e hidrólisis de la fosfina para reducirlos y dar como resultado un óxido de fosfina estable y 2 grupos sulfidrilos, sin embargo, este mecanismo está especialmente sujeto a

la presencia de agua (De la Torre et al., 2020). Al tener un carácter hidrofílico, el TCEP tiende a actuar principalmente en el citoplasma, pudiendo dejar más expuestas a las membranas frente a los radicales libres, lo cual pudo afectar su morfología debido al daño en los lípidos dentro de su estructura y por ende a la viabilidad de los ovocitos.

En cuanto a los porcentajes de ovocitos viables, el presente estudio reportó porcentajes menores a los obtenidos por Moadwad et al. (2017) y Gunawan et al. (2021). Esto puede explicarse por el método utilizado para evaluar la viabilidad, puesto que estos autores utilizaron solamente la evaluación morfológica para determinar este factor, considerando viables aquellos ovocitos que visualmente mantuvieron su forma esférica simétrica y las condiciones de la zona pelúcida y citoplasma. Didion et al. (1990) destaca la importancia de emplear tinciones vitales (técnicas para teñir células vivas sin causar su muerte) para complementar el análisis morfológico de ovocitos criopreservados y conseguir resultados más precisos, resaltando que los ovocitos pueden conservar su forma intacta y aun así mostrar resultados negativos con las tinciones, es decir, estar estructuralmente conservados pero ser fisiológicamente inviables. Algunos ejemplos de tinciones vitales son: verde jano, naranja de acridina, diacetato de fluoresceína, azul de tripán, etc. Esto puede comprobarse con los

porcentajes del estudio de Pereira et al. (2019), estudio en el cual utilizaron 2 tinciones para evaluar la viabilidad y cuyos resultados fueron similares a los obtenidos en este estudio.

5.2. Efecto del TCEP sobre la maduración in vitro de ovocitos porcinos vitrificados

Este estudio obtuvo una tasa de maduración nuclear de 13,59% en el tratamiento con TCEP, sin embargo, no hubo diferencia significativa con la tasa obtenida del tratamiento sin suplementar (12,49%). Las investigaciones sobre maduración in vitro de ovocitos con TCEP son muy escasas, empero hay algunos estudios con antioxidantes con el mismo mecanismo de acción que pueden usarse como punto de referencia.

Gunawan et al. (2021) obtuvieron resultados similares a este estudio al suplementar con glutatión tratamientos para ovocitos ovinos, no encontrando diferencia significativa entre la tasa de maduración del tratamiento suplementado y el tratamiento control (59,38% y 53,13%). Esto podría indicar que el TCEP tiene efecto sobre la maduración in vitro de los ovocitos comparable al de otros antioxidantes ya utilizados en MIV y en constante investigación, pese a no observar diferencia significativa entre los tratamientos. Gupta et al. (2007) resalta la

necesidad de seguir investigando sobre la criopreservación de ovocitos puesto que no hay protocolos definitivos que muestren suficiente efectividad.

Por otra parte, los resultados de este estudio difieren con los reportados por Zeng et al. (2021) que obtuvieron una tasa de maduración nuclear de 93,9% al adicionar TCEP a los medios de maduración de ovocitos porcinos, un porcentaje significativamente mayor al 79,3% obtenido por el tratamiento sin suplementar. Resultados parecidos a ello reportaron Moadwad et al. (2017) que obtuvieron una tasa de maduración nuclear de 80% al agregar glutatión en medios utilizados en ovocitos de ratones, observando diferencia significativa con el grupo control que obtuvo 67,27%.

Esto puede explicarse mediante un factor crucial en la recolección de las muestras: la edad de las hembras de las que se colectan los ovarios; debido a que en los centros de beneficio lo más usual es encontrar cerdas prépuberes, éstas representan la vasta mayoría de donantes de ovocitos para experimentos científicos. Al comparar los ovocitos de cerdas prepúberes y cerdas que ya pasaron varios ciclos estrales se reportaron diferencias relevantes en la capacidad de desarrollo tanto in vitro como in vivo, observando que los ovocitos de cerdas prepúberes tenían una reducida expresión de genes y proteínas involucradas en el

metabolismo y respuesta al estrés oxidativo (Pawlak et al, 2015). Se puede sospechar que la diferencia entre los resultados de este estudio y los obtenidos por Zeng et al. (2021) y Moadwad et al. (2017) radica en la calidad de los ovocitos utilizados en cada repetición, característica que depende en gran medida de la madurez sexual de las cerdas de las cuales se obtuvo las muestras, y la cual varía copiosamente según los animales llevados a los centros de beneficio.

Respecto a los porcentajes de ovocitos en metafase II o maduros, el presente estudio reportó porcentajes menores que los obtenidos por Gunawan et al. (2021), Zeng et al. (2021) y Moadwad et al. (2017). Esto puede explicarse por el método utilizado para determinar la maduración nuclear, dado que los autores mencionados emplearon sólo observación directa en microscopio para determinar el estado de los ovocitos, considerando como maduros a aquellos que presentaron el primer cuerpo polar. En cambio, en el presente estudio se utilizó la tinción Hoechst para determinar las diferentes fases de maduración nuclear alcanzada, considerando maduros a aquellos ovocitos que presentaron primer cuerpo polar y cromosomas teñidos a la observación con microscopio de fluorescencia.

5.3. Contrastación de hipótesis

Ho: El TCEP no tiene efecto sobre la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos vitrificados en vesícula germinal.

Ha: El TCEP tiene efecto sobre la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos vitrificados en fase de vesícula germinal.

Nivel de significancia: $\alpha = 0,05$

Prueba estadística: LSD

Valor crítico:

Si $P < 0,05$ = se acepta la Ha, se rechaza la Ho

Si $P > 0,05$ = se acepta la Ho, se rechaza la Ha

Toma de decisión:

Según el análisis estadístico no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en los 2 tratamientos siendo $p > 0,05$, por lo cual se rechaza la Ha y se acepta la Ho.

Conclusión:

Tanto T1 con TCEP como T2 sin TCEP tienen resultados similares en el porcentaje de viabilidad y la tasa de maduración nuclear, siendo ambos significativamente menores a los resultados obtenidos por el grupo control.

CONCLUSIONES

- El uso del antioxidante clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) no afecta la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos porcinos vitrificados en fase de vesícula germinal.
- La tasa de viabilidad de los ovocitos porcinos vitrificados no se ve afectada por la adición de TCEP.
- La tasa de maduración nuclear de los ovocitos porcinos vitrificados con TCEP es similar a la tasa obtenida por los ovocitos vitrificados sin TCEP.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios comparando el efecto del TCEP sobre la viabilidad de ovocitos al adicionarlo en diferentes concentraciones en medio de vitrificación.
- Realizar estudios respecto al efecto del TCEP sobre la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos al usarse en combinación con antioxidantes lipófilos como DMSO, vitamina E, etc.
- Realizar estudios con respecto a los métodos utilizados para determinar la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos crioconservados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boeta, M., Balcázar S., A., Cerbón, J. L., Hernández Medrano, J. H., Hernández Cerón, J., Páramo Ramírez, R. M., Porras Almeraya, A. I., Rangel, L., Salgado, B., Valencia, J., & Zarco, L. (2018). *Fisiología Reproductiva de los Animales Domésticos* (1a ed.). Universidad Nacional Autónoma de México. <https://ulibros.com/fisiologia-reproductiva-animales-domesticos-ncer2.html>
- Breeuwer, P., & Abee, T. (2000). *Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques*. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), 193–200. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00163-X)
- Chen, P. R., Uh, K., Redel, B. K., Reese, E. D., Prather, R. S., & Lee, K. (2022). *Production of Pigs From Porcine Embryos Generated in vitro*. *Frontiers in Animal Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fanim.2022.826324>
- Corrales, L. C., & Muñoz Ariza, M. M. (2012). *Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno*. *Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 10(8), 135–250. <https://doi.org/10.22490/24629448.1010>

- Dai, J., Wu, C., Muneri, C. W., Niu, Y., Zhang, S., Rui, R., & Zhang, D. (2015). *Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability*. *Cryobiology*, 71(2), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.002>
- De la Torre, B. G., Mthembu, S. N., Sharma, A., & Albericio, F. (2020). *Breaking a Couple: Disulfide Reducing Agents*. *ChemBioChem*, 21(14), 1947–1954. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000092>
- Delgado Olivares, L., Betanzos Cabrera, G., & Sumaya Martínez, M. T. (2010). *Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo*. *Revista Investigación y Ciencia*, 50, 10–15. <https://investigacion.uaa.mx/RevistalyC/archivo/revista50/Articulo%202.pdf>
- Descriptores en Ciencias de la Salud (DECS) (2011) Oocitos. Biblioteca Virtual en Salud. Centro Latinoamericano y del Caribe de Información en Ciencias de la Salud. https://decs.bvsalud.org/es/ths/resource/?id=10048&filter=ths_term_all&q=Oocitos#Details
- Didion, B. A., Pomp, D., Martin, M. J., Homanics, G. E., & Markert, C. L. (1990). *Observations on the cooling and cryopreservation of pig*

oocytes at the germinal vesicle stage. Journal of Animal Science, 68(9), 2803. <https://doi.org/10.2527/1990.6892803x>

Galeati, G., Spinaci, M., Vallorani, C., Bucci, D., Porcu, E., & Tamanini, C. (2011). *Pig oocyte vitrification by cryotop method: Effects on viability, spindle and chromosome configuration and in vitro fertilization*. Animal Reproduction Science, 127(1–2), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.07.010>

Galina, C. (2021). *Reproducción de los animales domésticos*. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/index.html>

García Amador, M. I., Martínez Armas, R., & Ruvalcaba Castellón, L. A. (2011). *Vitrificación de ovocitos y embriones*. Revista Mexicana de Medicina de La Reproducción, 3(4), 143–149. <https://www.reproduccion.org.mx/articulo/h5strongvitrificacioacuten-de-ovocitos-y-embryosnbspstrongh5-h6strongvitrification-of-oocytes-and-embryosstrongh6>

Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R., & Selvin, P. R. (1999). *A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris (2-carboxyethyl) phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry 1*. Analytical Biochemistry, 273, 73–80. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4203>

- Gordon, I. (2004). *Reproductive Technologies in Farm Animals*. CABI Publishing. <https://cabidigitallibrary.org>
- Gunawan, M., Nuriza, N., Kaiin, E. M., & Sjahfirdi, L. (2021). *The effect of glutathione antioxidant addition in maturation medium on the morphology of Garut sheep (Ovis aries) oocytes after vitrification*. *Journal of Physics: Conference Series*, 1725(1), 012062. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1725/1/012062>
- Gupta, M. K., Uhm, S. J., & Lee, H. T. (2007). *Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification*. *Theriogenology*, 67(2), 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.015>
- Gupta, M. K., Uhm, S. J., & Lee, H. T. (2010). *Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization*. *Fertility and Sterility*, 93(8), 2602–2607. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.043>
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (7ma ed.). McGraw-Hill Interamericana Editores. <https://es.scribd.com/document/394898878/Reproduccion-e-Inseminacion-Artificial-Hafez>

- Hardy, K., Wright, C. S., Franks, S., & Winston, R. M. L. (2000). *In vitro maturation of oocytes*. *British Medical Bulletin*, 56(3), 588–602.
<https://academic.oup.com/bmb/article/56/3/588/351248>
- Ito, J., Shirasuna, K., Kuwayama, T., & Iwata, H. (2020). *Resveratrol treatment increases mitochondrial biogenesis and improves viability of porcine germinal-vesicle stage vitrified-warmed oocytes*. *Cryobiology*, 93, 37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.02.014>
- Iwata, H., Goto, H., Tanaka, H., Sakaguchi, Y., Kimura, K., Kuwayama, T., & Monji, Y. (2011). *Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes*. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(3), 424–432.
<https://doi.org/10.1071/RD10133>
- Koutlaki Kourti, N., Schoepper, B., Maroulis, G., Diedrich, K., & Al-Hasani, S. (2006). *Human oocyte cryopreservation: Past, present and future*. In *Reproductive BioMedicine Online* (Vol. 13, Issue 3, pp. 427–436). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61449-6](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61449-6)
- Kroemer, T. (2021). *Todo acerca de TCEP – El Agente Reductor Inodoro*. Gold Biotechnology. <https://goldbio.com/articles/article/acerca-de-TCEP-Agente-Reductor-Inodoro>

- Lasiene, K., Lasys, V., Glinskyte, S., Valanciute, A., & Vitkus, A. (2011). *Relevance and methodology for the morphological analysis of oocyte quality in IVF and ICSI*. *J Reprod Stem Cell Biotechnol*, 2(1), 1–13. <https://doi.org/10.1177/205891581100200102>
- Mateo-Otero, Y., Yeste, M., Damato, A., & Giaretta, E. (2021). *Cryopreservation and oxidative stress in porcine oocytes*. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 135, pp. 20–26). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.12.024>
- Membrillo Ortega, A., Córdova Izquierdo, A., Hicks Gómez, J. J., Olivares-Corichi, I. M., Martínez Torres, V. M., & Valencia Méndez, J. d J. (2003). *Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión*. *Interciencia*, 28(12), 699–704. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33908704.pdf>
- Moawad, A. R., Tan, S. L., & Taketo, T. (2017). *Beneficial effects of glutathione supplementation during vitrification of mouse oocytes at the germinal vesicle stage on their preimplantation development following maturation and fertilization in vitro*. *Cryobiology*, 76, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.002>
- Niemann, H., & Rath, D. (2001). *Progress in Reproductive Biotechnology in Swine*. *Theriogenology*, 56, 1291–1304. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00630-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00630-6)

- Nohalez, A., Martinez, C. A., Gil, M. A., Almiñana, C., Roca, J., Martinez, E. A., & Cuello, C. (2015). *Effects of two combinations of cryoprotectants on the invitro developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes*. *Theriogenology*, 84(4), 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.004>
- Pawlak, P., Warzych, E., Hryciuk, M., & Lechniak, D. (2015). *Transcript abundance, glutathione and apoptosis levels differ between porcine oocytes collected from prepubertal and cyclic gilts*. *Theriogenology*, 84(1), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.02.016>
- Pereira, B. A., Zangeronimo, M. G., Castillo-Martín, M., Gadani, B., Chaves, B. R., Rodríguez-Gil, J. E., Bonet, S., & Yeste, M. (2019). *Supplementing maturation medium with insulin growth factor i and vitrification-warming solutions with reduced glutathione enhances survival rates and development ability of in vitro matured vitrified-warmed pig oocytes*. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01894>
- Prentice, J. R., & Anzar, M. (2011). *Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics*. In *Veterinary Medicine International* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.4061/2011/146405>
- Santos, E. C. S., Appeltant, R., Dang-Nguyen, T. Q., Noguchi, J., Kaneko, H., Kikuchi, K., & Somfai, T. (2018). *The effect of resveratrol on the*

developmental competence of porcine oocytes vitrified at germinal vesicle stage. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(2), 304–312.

<https://doi.org/10.1111/rda.13105>

Sequeira, L. T. (2013). *Compendio sobre Reproducción Animal* (1a ed.).
Universidad Nacional Agraria.

<https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/2473>

Somfai, T., Ozawa, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Kuriani Karja, N. W., Farhudin, M., Dinnyés, A., Nagai, T., & Kikuchi, K. (2007). *Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage*.

Cryobiology, 55(2), 115–126.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.06.008>

Tang, Y., Zhang, Y., Liu, L., Yang, Y., Wang, Y., & Xu, B. (2022). *Glycine and Melatonin Improve Preimplantation Development of Porcine Oocytes Vitrified at the Germinal Vesicle Stage*. *Frontiers in Cell and*

Developmental Biology, 10.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.856486>

Tatone, C., di Emidio, G., Vitti, M., di Carlo, M., Santini, S., D'Alessandro, A. M., Falone, S., & Amicarelli, F. (2015). *Sirtuin Functions in Female Fertility: Possible Role in Oxidative Stress and Aging*. *Oxidative*

Medicine and Cellular Longevity, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/659687>

Terrill, J. R., Radley-Crabb, H. G., Iwasaki, T., Lemckert, F. A., Arthur, P. G., & Grounds, M. D. (2013). *Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies*. *The FEBS Journal*, 280(17), 4149–4164.
<https://doi.org/10.1111/febs.12142>

Tharasanit, T., & Thuwanut, P. (2021). *Oocyte cryopreservation in domestic animals and humans: Principles, techniques and updated outcomes*. In *Animals* (Vol. 11, Issue 10). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/ani11102949>

Torres-Osorio, V., Urrego, R., Echeverri Zuluaga, J. J., & López-Herrera, A. (2019). *Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos. Revisión*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(2), 433–459.
<https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>

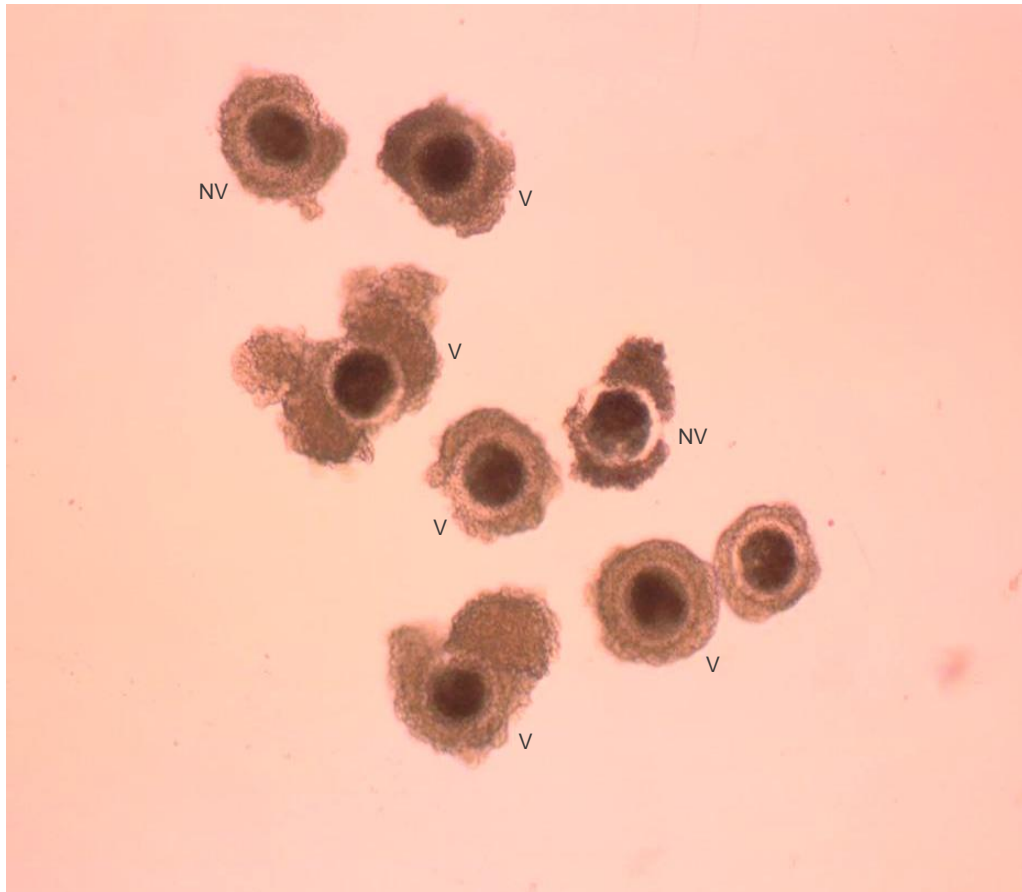
Vargas Tominaga, L., Pella Cáceres, R., Vargas Lechuga, A., & Bartolo Durán, L. (2012). *Maduración in vitro de ovocitos: alternativa efectiva en reproducción asistida*. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 58, 263–266.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9506011>

- Viada Pupo, E., Gómez Robles, L., & Reyna Campaña Marrero, I. (2017). *Oxidative Stress*. *Correo Científico Médico de Holguín*, 1, 171–186. <http://scielo.sld.cu/pdf/ccm/v21n1/ccm14117.pdf>
- Wu, G., Jia, B., Mo, X., Liu, C., Fu, X., Zhu, S., & Hou, Y. (2013). *Nuclear maturation and embryo development of porcine oocytes vitrified by cryotop: Effect of different stages of in vitro maturation*. *Cryobiology*, 67(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.010>
- Xiang, D. C., Jia, B. Y., Fu, X. W., Guo, J. X., Hong, Q. H., Quan, G. B., & Wu, G. Q. (2021). *Role of astaxanthin as an efficient antioxidant on the in vitro maturation and vitrification of porcine oocytes*. *Theriogenology*, 167, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.03.006>
- Zeng, Y., Shinada, K., Hano, K., Sui, L., Yang, T., Li, X., & Himaki, T. (2021). *Effects of tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride treatment on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent in vitro fertilized embryo developmental capacity*. *Theriogenology*, 162, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.027>

ANEXOS

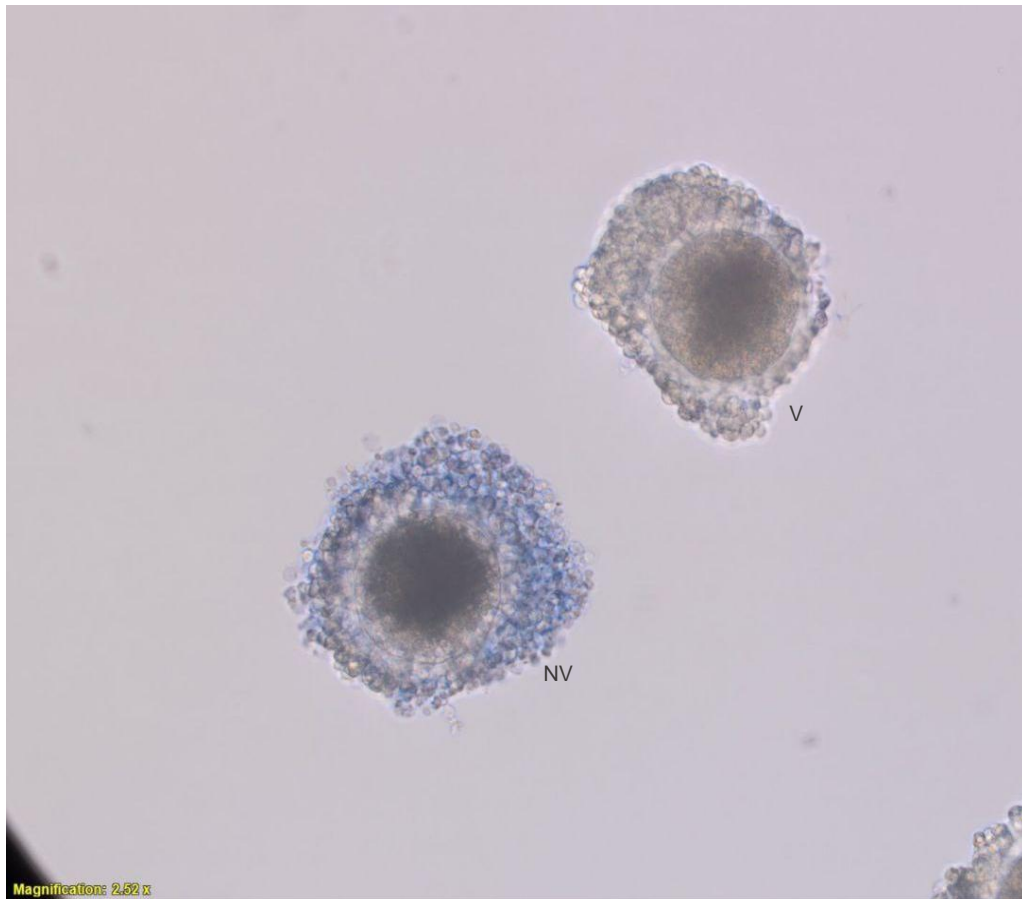
Anexo 1. Ovocitos porcinos viables y no viables. Evaluación morfológica.

Microscopio invertido, magnificación 2,52x

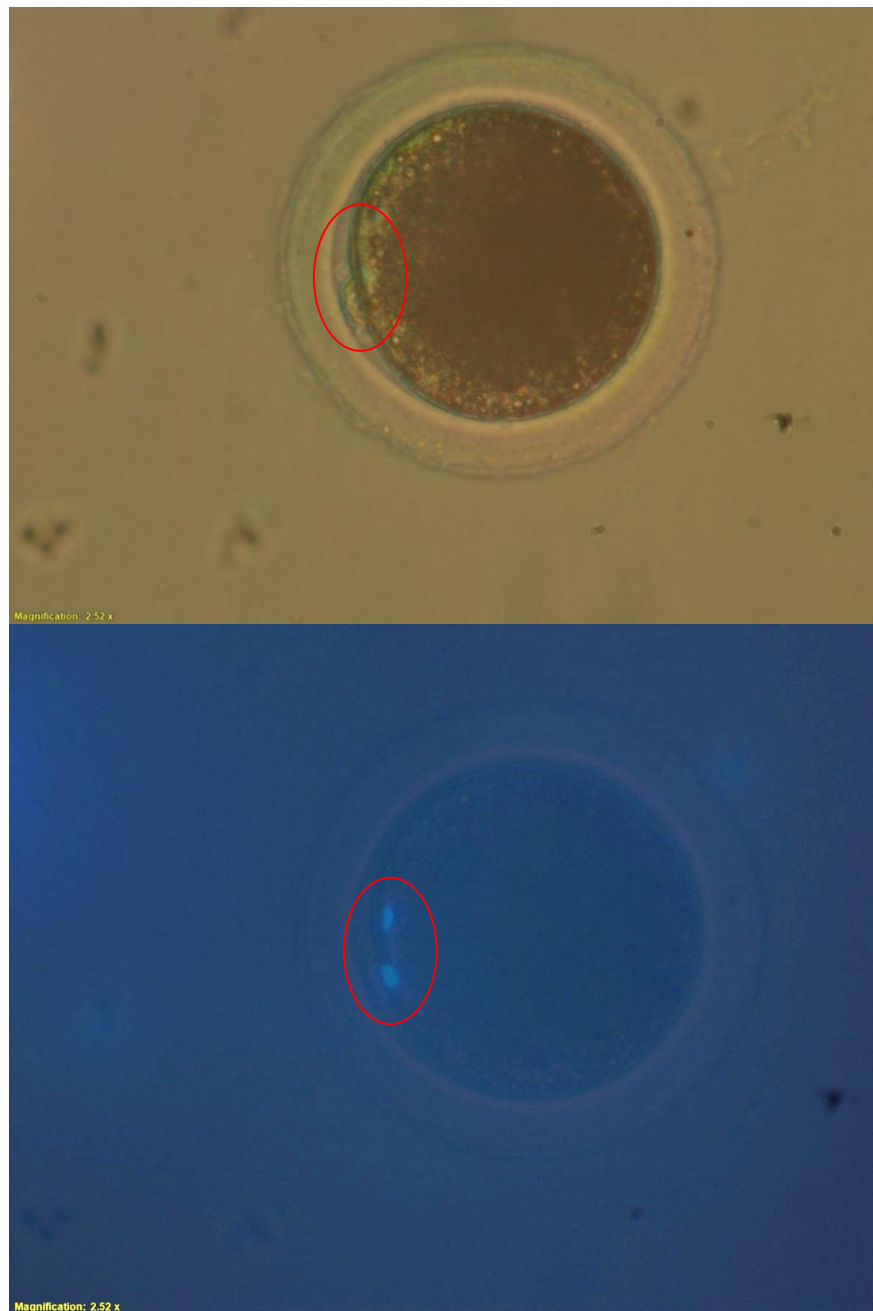


V = viable, NV = no viable

Anexo 2. Ovocitos porcinos viables y no viables. Tinción con azul de tripán al 0,05%. Microscopio invertido, magnificación 2,52x



Anexo 3. Ovocitos porcinos en fase de Metafase II con el primer cuerpo polar y cromosomas teñidos (círculo rojo). Tinción Hoechst (33342). Microscopio de fluorescencia, magnificación 2,52x



Anexo 4. Datos empleados para el análisis estadístico

Registro de datos de maduración in vitro

Tramamiento	VG	MI	A	MII	D	Total
Control	3	1		4		8
Control	10	2				12
Control	2			2		4
Control	2	2	1	1	3	9
Control	1	5		4	2	12
Control	1	7		3	13	24
Control	3	8		4	10	25
Control	2	2		1		5
Control	7	2		18		27
Control	4	16	2	27	1	50
Total	35	45	3	64	29	176
Media	3.5	5	1.5	7.1111	5.8	17.6
DE	2.877	4.822	0.707	9.089	5.357	14.167
ErrorEstand	0.217	0.363	0.053	0.685	0.404	1.068

Tramamiento	VG	MI	A	MII	D	Total
T 1	1	8	0	4	10	23
T 1	5	5	0			10
T 1	4	6	0	5	4	19
T 1	7	5	0	1	3	16
T 1	15	2	0	8	7	32
T 1	13	29	0	6		48
T 1	8	25	0	3	3	39
Total	53	80	0	27	27	187
Media	7.571	11.429	0.000	4.500	5.400	26.714
DE	4.962	10.845	0.000	2.429	3.050	13.537
EE	0.363	0.793	0.000	0.178	0.223	0.990

Tramamiento	VG	MI	A	MII	D	Total
T 2	4	8	0	4	10	26
T 2	6	12	0		9	27
T 2	4	5	0	9	6	24
T 2	2	2	0		5	9
T 2	10	1	0		4	15
T 2	16	21	0	9	2	48
T 2	18	12	0	6	2	38
Total	60	61	0	28	38	187
Media	8.571	8.714	0.000	7.000	5.429	26.714
DE	6.294	6.969	0.000	2.449	3.155	13.162
EE	0.460	0.510	0.000	0.179	0.231	0.963

Registro de datos de viabilidad

Tratamiento	VIVOS	MUERTOS	TOTAL
Control	35	2	37
Control	36	2	38
Control	34	2	36
Control	30	1	31
Control	32	0	32
Control	37	9	46
Control	42	0	42
Control	45	0	45
Control	40	3	43
Total	331	19	350
Media	36.778	2.111	38.889
DESV	4.816	2.928	5.442
EE.EE	0.265	0.672	0.291

Tratamiento	VIVOS	MUERTOS	TOTAL
T 1	24	8	32
T 1	12	4	16
T 1	16	52	68
T 1	17	15	32
T 1	16	36	52
T 1	12	44	56
T 1	24	24	48
T 1	23	41	64
T 1	44	14	58
total	188	238	426
Media	20.889	26.444	47.333
DE	9.867	17.321	17.205
EE	0.478	0.839	0.834

Tratamiento	VIVOS	MUERTOS	TOTAL
T 2	24	8	32
T 2	40	84	124
T 2	17	15	32
T 2	8	56	64
T 2	24	8	32
T 2	4	36	40
T 2	8	28	36
T 2	40	68	108
T 2	24	12	36
Total	189	315	504
Media	21.000	35.000	56.000
DE	13.191	28.213	35.665
EE	0.588	1.257	1.589

Anexo 5. Análisis estadístico

Análisis estadístico en R Studio para viabilidad de ovocitos según tratamiento

```
> vivos=lm(`VIVOS %` ~ Tratamiento,data=VIA)
> anova(vivos)
Analysis of Variance Table

Response: VIVOS %
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tratamiento  2 16303.2  8151.6  21.377 3.234e-06 ***
Residuals   26  9914.5   381.3
Signif. codes:
  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> out2<-LSD.test(vivos,"Tratamiento",p.adj="bonferroni")
> out2

$statistics
      MSerror Df   Mean   CV
381.3276 26 64.23628 30.39966

$parameters
      test p.adjusted  name.t ntr alpha
Fisher-LSD bonferroni Tratamiento  3 0.05
```

\$means

	VIVOS %	std r	se	LCL	UCL
Control	94.39922	7.743463	11	5.887796	82.29668 106.50176
V-Control	42.64544	25.766760	9	6.509204	29.26558 56.02530
V-Tris	48.96131	22.370453	9	6.509204	35.58145 62.34117

	Min	Max	Q25	Q50	Q75
Control	72.72727	100.00000	94.03509	95.00000	100.00000
V-Control	10.00000	75.00000	22.22222	37.03704	66.66667
V-Tris	21.42857	75.86207	30.76923	50.00000	75.00000

\$comparison

NULL

\$groups

	VIVOS %	groups
Control	94.39922	a
V-Tris	48.96131	b
V-Control	42.64544	b

**Análisis estadístico en R Studio para maduración in vitro de ovocitos
según tratamiento**

```
> mll=lm(` MII%` ~ Tratamiento,data=MAD)
```

```
> anova(mll)
```

```
Analysis of Variance Table
```

```
Response: MII%
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
```

```
Tratamiento  3 2747.3  915.76  3.2077 0.03706 *
```

```
Residuals   30 8564.7  285.49
```

```
Signif. codes:
```

```
0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> MII<-LSD.test(mll,"Tratamiento",p.adj="none")
```

```
> MII
```

```
$statistics
```

```
MSerror Df  Mean  CV
```

```
285.4901 30 23.77634 71.06414
```

```
$parameters
```

```
test p.adjusted name.t ntr alpha
```

```
Fisher-LSD none Tratamiento 4 0.05
```

```
$means
```

```
      MII%  std r  se  LCL
```

```
Control 31.36111 22.539027 10 5.343127 20.4489899
```

V-Control 12.48916 13.856126 7 6.386258 -0.5533238

V-Tris 13.59277 9.841394 7 6.386258 0.5502922

	UCL	Min	Max	Q25	Q50
Control	42.27323	0	66.66667	13.375000	26.66667
V-Control	25.53164	0	37.50000	0.000000	15.38462
V-Tris	26.63525	0	26.31579	6.971154	12.50000

Q75

Control 50.00000

V-Control 17.26974

V-Tris 21.19565

\$comparison

NULL

\$groups

MII% groups

Control 31.36111 a

V-Tris 13.59277 b

V-Control 12.48916 b

Anexo 6. Porcentaje de ovocitos viables según tratamiento

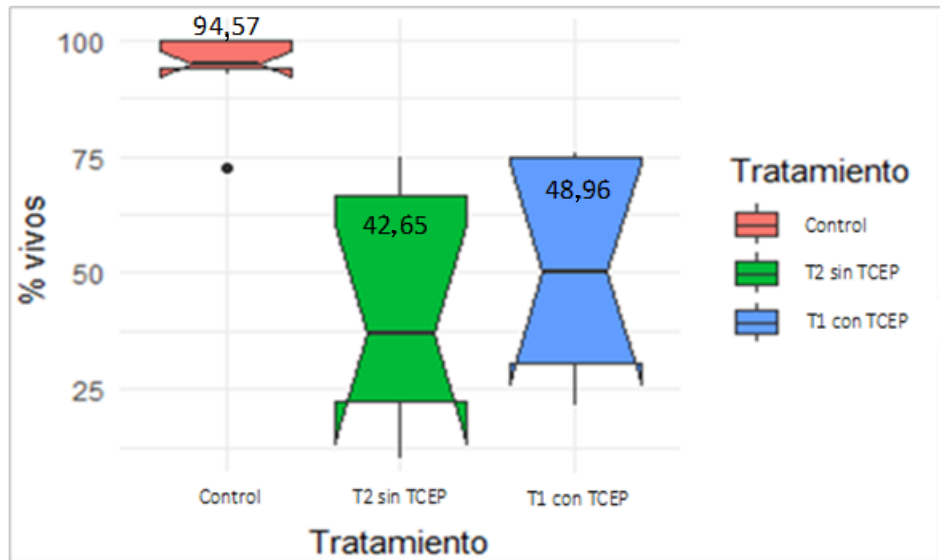


Figura 1. Porcentaje de ovocitos viables según tratamiento

Anexo 7. Porcentaje de ovocitos en fase de metafase II según tratamiento

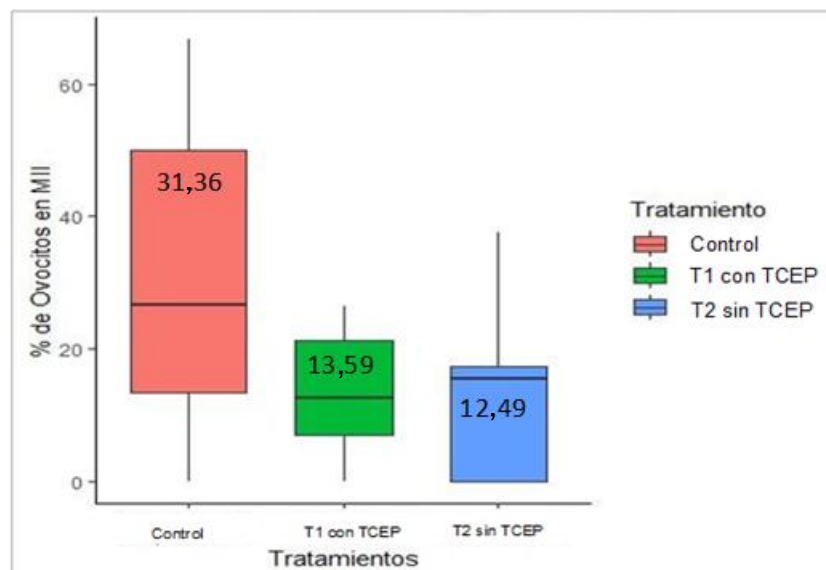


Figura 2. Porcentaje de ovocitos en fase de metafase II según tratamiento