

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**EFFECTO DEL IGF-I Y BETA-MERCAPTOETHANOL EN LA
MADURACIÓN IN VITRO EN OVOCITOS DE
PORCINO, TACNA - 2024**

TESIS

Presentada por:

Bach. ALEXANDRA MILAGROS CORDOVA HUIZA

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

TACNA – PERÚ

2026

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TESIS

EFFECTO DEL IGF-I Y BETA-MERCAPTOETHANOL EN LA MADURACIÓN IN VITRO EN OVOCITOS DE PORCINO, TACNA 2024

Tesis sustentada y aprobada el día 6 de noviembre del 2025, siendo el jurado calificador:

PRESIDENTE


MSc. Cesario Sebastián Cruz Anchapuri

Secretario


MSc. Duany Condemayta Cutipa

Miembro


MSc. Maribel Fortunata Medina Rojas

Asesor


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° 8176-2023-FCAG del trabajo de tesis titulado: "EFECTO DEL IGF-I Y BETA-MERCAPTOETHANOL EN LA MADURACIÓN IN VITRO EN OVOCITOS DE PORCINO, TACNA 2024", presentada por la Bachiller ALEXANDRA MILAGROS CORDOVA HUIZA 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 13%.

Por lo que **CERTIFICO LA SIMILARIDAD** de la tesis 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, 28 de abril del 2026

FIRMA ASESOR

Nombres y apellidos



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



FIRMA TESISTA

Nombres y apellidos



.....
Bach. Alexandra Milagros Cordova Huiza
DNI N° 73992380



DEDICATORIA

A mi madre, Edith Huiza Ramos, por darme la fortaleza y el ejemplo de seguir y perseverar en la vida profesional.

A mi padre, Poyes Patricio Córdova Mamani, por su apoyo incondicional y por brindarme sus consejos para crecer como profesional.

A mi hermano, Yordan, quien me tuvo paciencia y cuidó de mí en mis tiempos de estudio, y a mis hermanitos, Gustavo y Alejandra, por alegrar mis días.

A Richard, quien estuvo a mi lado, dándome ánimos y la fuerza que me faltaba para seguir adelante en mi etapa universitaria.

A mis mejores amigas Beatriz, Elizabeth y Kelly, que me acompañaron en cada una de mis aventuras, y me brindaron su sincera amistad en este largo camino.

A mí misma, por mi esfuerzo, constancia y por no rendirme incluso en los momentos más difíciles; por ser persistente, disciplinada y creer en mi capacidad de lograrlo.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitirme vivir en este tiempo, rodeada de personas maravillosas que enriquecen cada uno de los días de mi vida.

A la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por abrirme las puertas de sus aulas y contribuir de manera decisiva a mi formación profesional.

A mis asesoras, MSc. Elizabeth Soledad Chucuya Mamani y Mvz. Angelina Puma Iquise, por compartir sus conocimientos, guiarme con dedicación y paciencia durante el desarrollo de esta tesis.

A los docentes de la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, quienes con su dedicación moldearon mi aprendizaje y me transmitieron saberes esenciales para mi crecimiento profesional.

*Al Proyecto “ROL DEL ANTIOXIDANTE CLORHIDRATO DE TRIS (2-CARBOXYIETIL) FOSFINA (TCEP) EN LA CRIOTOLERANCIA DE OVOCITOS Y SU POTENCIAL DE DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO EN PORCINO (*Sus scrofa domesticus*)”, aprobado como proyecto ganador mediante la Resolución Rectoral N.º 10979-2023-UN/JBG. Los recursos para su ejecución provinieron de los fondos del Canon, Sobrecañon y Regalías Mineras de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.*

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. Descripción del problema	3
1.2. Justificación	4
1.3. Objetivos	6
1.3.1. Objetivo general	6
1.3.2. Objetivos específicos	6
1.4. Hipótesis	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antecedentes	7
2.2. Base teórica	11
2.2.1. Fisiología de la reproducción porcina	11
2.2.2. Maduración <i>in vitro</i>	17
2.2.3. Antioxidantes de la producción in vitro	22
2.2.4. Factores de crecimiento y uso en la producción in vitro.	24
2.2.5. Tinción	27

2.3. Conceptos Básicos	27
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	30
3.1. Material	30
3.1.1. Ubicación geográfica	30
3.1.2. Población y muestra	30
3.1.3. Materiales	32
3.2. Método	33
3.2.1. Tipo de investigación	33
3.2.2. Nivel de investigación	33
3.2.3. Diseño de la investigación	33
3.2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	34
3.2.5. Método de análisis de datos	36
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	38
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES.....	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 : <i>Resultados de estadíos de maduración según tratamientos expresados en % (media $\pm$ error estándar).....</i>	38
Tabla 2 : <i>Resultados de estadios de maduración nuclear de Control vs IGF-1 expresados en % (media $\pm$ error estándar).</i>	40
Tabla 3 : <i>Resultados de estadios de maduración de los tratamientos Control vs Beta-mercaptoetanol expresados en % (media $\pm$ error estándar).....</i>	42
Tabla 4 : <i>Resultados de estadios de maduración de Control vs B+IGF-1 expresados en % (media $\pm$ error estándar).....</i>	44
Tabla 5 : <i>Número de ovocitos en estadios vesícula germinal, metafase I, anafase, metafase II y degenerados (sin adición).</i>	86
Tabla 6 : <i>Número de ovocitos en estadios vesícula germinal, metafase I, anafase, metafase II y degenerados (con adición de IGF-1).</i>	86
Tabla 7 : <i>Número de ovocitos en estadios vesícula germinal, metafase I, anafase, metafase II y degenerados (con adición de beta - mercaptoetanol).....</i>	87
Tabla 8 : <i>Número de ovocitos en estadios vesícula germinal, metafase I, anafase, metafase II y degenerados (con adición de beta - mercaptoetanol + IGF - 1).....</i>	87

ACRÓNIMOS

β -ME: β -mercaptoetanol

IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1

MIV: Maduración in vitro

IVF: Fertilización in vitro

MII: Metafase II

VG: Vesícula germinal

FSH: Hormona foliculoestimulante

LH: Hormona luteinizante

EROs: Especies reactivas de oxígeno

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

COCs: Complejos cúmulo-ovocito

GSH: Glutación

TCM: Medio de cultivo celular

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

PI3K/AKT: Fosfatidilinositol 3-quinasa / Proteína quinasa B

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

SpFF: Fluido folicular porcino estándar

LpFF: Fluido folicular porcino de bajo peso molecular

BEL-2: Proteína B-cell lymphoma 2

INSR: Receptor de insulina

PVA: Alcohol polivinílico

RESUMEN

La investigación tuvo como propósito analizar el impacto del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) y del beta-mercaptoetanol (β ME) en el proceso de maduración nuclear in vitro de ovocitos porcinos. El estudio se desarrolló en la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú, durante el año 2024. Se recolectaron un total de 156 ovarios de gorrinas, de los cuales se aislaron ovocitos y se distribuyeron en cuatro tratamientos: T1 (TCM + IGF-1), T2 (TCM + β -ME), T3 (TCM + IGF-1 + β -ME), y T4 (control, TCM sin adiciones). La maduración in vitro se evaluó mediante la tinción Hoechst 33342, considerando como ovocitos maduros aquellos que alcanzaron la metafase II (MII). Los resultados mostraron que tanto el IGF-1 como el β -ME mejoraron significativamente las tasas de maduración nuclear, siendo la combinación de ambos compuestos la que logró mayor porcentaje de ovocitos en MII y menor degeneración. Estas contribuciones permiten optimizar las técnicas de reproducción asistida en porcinos, promoviendo la conservación genética y el incremento de la productividad pecuaria. En conclusión, la utilización conjunta de estos factores de crecimiento y antioxidantes representa una estrategia prometedora para mejorar los índices de maduración en procesos in vitro.

Palabras Clave: beta-mercaptoethanol, biotecnología reproductiva, criopreservación, Maduración in vitro, ovocitos porcinos, porcicultura.

ABSTRACT

The purpose of this research was to analyze the impact of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and beta-mercaptoethanol (β ME) on the in vitro nuclear maturation process of porcine oocytes. The study was conducted at the Jorge Basadre Grohmann National University in Tacna, Peru, during 2024. One hundred and fifty-six pig ovaries were collected, from which oocytes were isolated and distributed into four treatments: T1 (TCM + IGF-1), T2 (TCM + β -ME), T3 (TCM + IGF-1 + β -ME), and T4 (control, TCM without additives). In vitro maturation was assessed using Hoechst 33342 staining, with oocytes reaching metaphase II (MII) considered mature. The results showed that both IGF-1 and β -ME significantly improved nuclear maturation rates, with the combination of both compounds achieving the highest percentage of oocytes in MII and the lowest degeneration. These contributions allow for the optimization of assisted reproduction techniques in pigs, promoting genetic conservation and increased livestock productivity. In conclusion, the combined use of these growth factors and antioxidants represents a promising strategy for improving maturation rates in in vitro processes.

Keywords: beta-mercaptoethanol, reproductive biotechnology, cryopreservation, in vitro maturation, porcine oocytes, pig farming.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo ovocitario bajo condiciones de cultivo in vitro de porcinos es un avance clave en la biotecnología reproductiva y en la mejora genética del sector porcino, relevante para la economía peruana. La recuperación de ovocitos con niveles óptimos de viabilidad permite optimizar la generación de nuevos embriones, facilitando su conservación y asegurar la sostenibilidad de la industria (Tarazona, 2010).

A pesar de los avances, las tasas de maduración in vitro en porcinos aún son bajas, lo que limita el potencial reproductivo de los programas genéticos (Robledo et al., 2009). En este contexto, la suplementación de los medios de maduración con factores de crecimiento y antioxidantes ha emergido como una estrategia prometedora para mejorar estos índices. El IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina) es una hormona que, de acuerdo con Yoshioka et al. (2002), favorece la proliferación celular, la esteroidogénesis y la maduración de los ovocitos. En contraste, el beta-mercaptoetanol, un antioxidante que reduce el estrés oxidativo en el citoplasma ovocitario, ha demostrado en investigaciones previas incrementar los niveles de maduración en diversas especies. (Merlo et al., 2016).

La metodología de este estudio consistió en evaluar diferentes tratamientos que incluyen IGF-1, Beta-mercaptoethanol y su combinación, en medios de maduración de ovocitos porcinos, con el fin de determinar su efecto en el progreso hacia la fase de Metafase II. La maduración nuclear es crucial, puesto que impacta directamente en la fertilización y el desarrollo embrionario (Cuello et al., 2005).

Este proyecto resulta de gran importancia para el sector porcino, ya que el perfeccionamiento de la maduración in vitro puede incrementar el rendimiento de programas de reproducción asistida, promover la conservación genética y potenciar la sostenibilidad de la industria. Además, la integración de estos compuestos en los protocolos de maduración puede representar un gran avance para mejorar las tasas de éxito y la calidad de ovocitos disponibles para tecnologías como la vitrificación y fertilización in vitro.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del problema

La importación de porcinos ha sido clave para el avance de la porcicultura, fomentando el desarrollo de hembras con fines de producción de embriones. Sin embargo, al culminar su etapa reproductiva, estas son beneficiadas en el camal, lo que implica desaprovechar la oportunidad de conservar su material genético mediante la vitrificación de ovocitos, sin embargo para llegar a esta etapa se requiere mejorar la maduración de ovocitos in vitro, ya que algunos autores sustentan que la tasa de maduración es baja (Cuello et al., 2005), por ejemplo en caninos es de 2,7 % (Sato et al., 2018), en alpacas 42,22 % (Guillén, 2018), en porcinos 32,1 % (Fernandez et al., 2010) a pesar de hacer una selección rigurosa de complejo cúmulos ovocito (COCs) en los laboratorios, menos de la mitad alcanza a llegar a la maduración de ovocitos in vitro de porcinos (Robledo et al., 2009), esto es ocasionado por problemas con el estrés oxidativo que desencadena en apoptosis de los ovocitos, para dar solución a este problema se han usado antioxidantes y factores de crecimiento (Tarazona, 2010).

Es por esto que se ha venido realizando estudios con factores de crecimiento que inducen el desarrollo de los ovocitos como es el caso del IGF-1 éste tiene un efecto positivo en la proliferación de células foliculares, maduración del ovocito, la esteroidogénesis y también puede inhibir la apoptosis en el medio de maduración (Yoshioka et al., 2002), con el uso de

IGF-1 se logró una maduración de ovocitos in vitro de 12,2 % en caninos (Sato et al., 2018), en alpacas 61,81 % (Guillén, 2018), El beta-mercaptoetanol, antioxidante similar a los alcoholes y fenoles, también se ha utilizado en cultivos de maduración para disminuir la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), ya que éstas son causantes del estrés oxidativo, sin embargo al agregar beta-mercaptoethanol al medio de maduración in vitro en búfalos se llegó al 76 % de maduración del ovocito (Pankaj, 2015).

Dado que estudios previos evidencian efectos positivos con la suplementación del medio de cultivo con antioxidantes y factores tróficos para la maduración ovocitaria en distintas especies, resulta pertinente evaluar la acción conjunta de un factor de crecimiento y un antioxidante tiol en la maduración de ovocitos porcinos.

1.2. Justificación

Una de las principales fuentes de consumo en el Perú es la carne de cerdo, este sector ha tenido un crecimiento notorio, ya que en el año 2011 el consumo per cápita anual era de 3,2 kilos, sin embargo en el 2023 el consumo per cápita anual fue de 10,2 kilos demostrando un incremento exponencial, dado que sigue creciendo hasta un 4 % de producción en la actualidad a diferencia de los otros rubros que han decaído hasta un -2 % (MIDAGRI, 2024).

Del mismo modo en la región de Tacna se ha visibilizado el crecimiento de la población de porcinos, ya que en el año 2021 se reportó 36 629 unidades de porcinos la cual fue aumentando para el año 2023

llegando a tener un total de 49 999 porcinos, esta cifra sigue aumentando hasta un 3,2 % en la actualidad (INEI, 2024).

El uso de la biotecnología y la genética ha impulsado el crecimiento de la porcicultura, aumentando los ingresos de los productores. Estas técnicas permiten obtener animales de alto valor genético y realizar cruces selectivos entre hembras con rasgos deseables y machos de élite. A la vez, se preservan las razas mediante la vitrificación de ovocitos y embriones seleccionados en laboratorio, libres de enfermedades, (Cuello et al., 2005), cabe resaltar que las casas genéticas porcinas en Perú importan porcinos vivos del extranjero generando mayores costos (PIC PERÚ, 2021), con riesgo de perder al reproductor importado en el trayecto del viaje, incluso pueden ser medio de transporte de enfermedades, es por esto que se busca preservar la raza mediante la vitrificación, pero para llegar a esto se debe lograr altas tasas de maduración en ovocitos (Nohales, 2018).

El principal interés de realizar esta investigación es lograr mayores tasas de maduración de ovocitos porcinos con la adición de IGF-1 y el beta-mercaptoethanol, siendo esta una posible solución para generar ovocitos madurados aptos para bancos de recursos genéticos permitiendo mantener la variabilidad genética de las diferentes razas de la especie representando un seguro de vida para la especie. (Gonzáles & Gonzáles 2005).

Los resultados obtenidos con este trabajo servirán como aporte para futuras investigaciones en la producción *in vitro*, ya que la biotecnología en porcinos en el Perú es un tema muy poco investigado, cabe mencionar que en nuestro país no se ha reportado ninguna investigación del antioxidante beta-mercaptoethanol en maduración *in vitro*, mientras que el IGF-1 sólo se ha usado para la maduración de ovocitos de alpacas.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del IGF-I y beta-mercaptoethanol en la maduración *in vitro* en ovocito de porcino, Tacna - 2024.

1.3.2. Objetivos específicos

- a) Determinar el efecto del IGF- 1 en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos de porcinos, Tacna - 2024.
- b) Determinar el efecto del beta-mercaptoethanol en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos de porcinos, Tacna - 2024.
- c) Determinar el efecto de la combinación del IGF-1 y beta-mercaptoethanol en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos de porcinos, Tacna - 2024.

1.4. Hipótesis

Hipótesis nula (H_0): La adición de IGF-1 y beta-mercaptoethanol no tiene efectos significativos en la maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de porcino.

Hipótesis alternativa (H_1): La adición de IGF-1 y beta-mercaptoethanol tiene efectos positivos y significativos en la maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de porcino.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. A nivel internacional

Pereira et al. (2019) demostraron que el uso de IGF-1 y glutatión en el cultivo de ovocitos de cerdo afecta su capacidad de desarrollo post-vitrificación. El estudio destaca cambios en la expresión génica vinculada a la apoptosis y al equilibrio redox, factores determinantes para la calidad del gameto madurado artificialmente. Aunque 100 ng/mL de IGF-1 no mejoró la maduración, sí aumentó la supervivencia tras la vitrificación y calentamiento, indicando un posible efecto protector frente al estrés térmico. Van et al. (2009) investigaron el papel del IGF-1 en la maduración in vitro de ovocitos y demostraron que este factor estimula rutas intracelulares como PI3K/Akt y MAPK, estas vías, vinculadas a la regulación del ciclo celular, impulsan la maduración nuclear y facilitan que los ovocitos pasen de estados inmaduros a etapas tempranas del proceso meiótico..

De igual manera, Sato et al. (2018) evaluaron diferentes concentraciones de IGF-1 en la maduración nuclear de ovocitos caninos, y determinaron los niveles de expresión de los genes INSR, IGF-1R e IGF-2R, presentes tanto en los ovocitos como en las células que conforman el cúmulo. Encontraron que 50 µg/mL de IGF-1 incrementó significativamente la tasa de ovocitos en metafase II, y que la concentración de IGF-1R en las células del cúmulo se incrementó tras el proceso de maduración in vitro (MIV), igualmente, Guilherme et al. (2013) estudiaron el efecto del IGF-1 (0,

60, 120, 180 y 240 ng/mL) junto al líquido folicular (SpFF y LpFF) durante la maduración in vitro de ovocitos porcinos. La adición de IGF-1 al medio suplementado con SpFF aumentó la maduración nuclear y mejoró los resultados de la fertilización in vitro, siendo las concentraciones de 122 y 179 ng/mL las más efectivas.

Rodríguez et al. (2021) encontraron que el IGF-1 mejora la expansión del cúmulo y la progresión meiótica en ovocitos bovinos, sobre todo cuando se combina con FSH y EGF, aumentando los que llegan a metafase II. Este efecto confirma su acción conjunta con otras hormonas reproductivas. Por su parte, Tiwari et al. (2017) reportaron que el IGF-1 favorece la maduración nuclear de ovocitos porcinos, aunque sin significancia estadística, posiblemente por la concentración empleada o la falta de condiciones complementarias.

En otra investigación, Nogueira et al. (2019) evaluaron ovocitos caprinos y encontraron que el IGF-1 mejoró la expresión de genes antiapoptóticos (BCL2) y disminuyó los niveles de caspasa-3, sugiriendo un papel protector del IGF-1 en la calidad ovocitaria durante la maduración in vitro, además, Wu et al. (2020), en ovocitos de ratón, concluyeron que el IGF-1 promueve la maduración nuclear al activar las vías PI3K/AKT y ERK1/2, mejorando la tasa de MII y la calidad citoplasmática. Estos resultados muestran que el efecto del IGF-1 es conservado en diversas especies, finalmente, Cao et al. (2022) señalaron que, aunque el IGF-1 tiene efectos positivos en la maduración in vitro, su concentración debe ser cuidadosamente ajustada, ya que concentraciones elevadas pueden inducir estrés oxidativo, comprometiendo la viabilidad del ovocito.

Diversos estudios han evaluado el efecto de compuestos antioxidantes como el β -mercaptoetanol (β -ME) sobre la maduración in vitro (MIV) de ovocitos en especies animales. En equinos, Merlo et al. (2016) investigaron la adición de β -ME en concentraciones de 0,1 y 0,7 mM durante la maduración de ovocitos. Los investigadores no observaron variaciones estadísticamente relevantes, concluyendo que la inclusión de β -ME no afecta la maduración citoplasmática de los ovocitos equinos.

Por su parte, Kobayashi et al. (2006) evaluaron la incorporación de 100 μ M de cisteamina (Cys) y 100 μ M de β -ME en un medio de maduración definido de ovocitos porcinos. Si bien no observaron diferencias en las tasas de maduración nuclear (Cys: 96 %; β -ME: 98 %) respecto al grupo control, sí se reportaron mejores resultados en el desarrollo embrionario posterior, con una formación de blastocistos del 46 % para Cys y del 32 % para β -ME, comparado con el grupo madurado con PVA. Estos resultados sugieren que tanto Cys como β -ME pueden mejorar la competencia de desarrollo embrionario tras la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), del mismo modo Sánchez et al. (2011) analizaron la influencia del β -mercaptoetanol en la maduración ovocitaria porcina in vitro. Los autores reportaron que la incorporación de este compuesto antioxidante contribuyó a mejorar las condiciones celulares del cultivo, favoreciendo la calidad ovocitaria y reduciendo los procesos asociados al estrés oxidativo.

Otros autores también han documentado efectos positivos del β -ME en ovocitos porcinos. Abeydeera et al. (1998) demostraron que la adición de β -ME durante la maduración incrementa el contenido intracelular de glutatión, lo cual está asociado a una mayor tasa de desarrollo a blastocisto

tras la fecundación in vitro. Tras la fecundación in vitro, se evaluó el efecto del β -ME en el proceso de fertilización, encontrando que su presencia favorece la penetración espermática y el desarrollo temprano de los embriones (Funahashi & Sano, 2005).

En un estudio más reciente, Qi et al. (2022) observaron que el β -ME favorece la maduración ovocitaria al mantener la homeostasis de la autofagia, lo que resalta su función como modulador celular en condiciones de cultivo in vitro. De igual forma, Tao et al. (2004) analizaron cómo el β -ME influye en la acción del óxido nítrico en ovocitos porcinos, concluyendo que su presencia puede modificar el comportamiento bioquímico de los ovocitos en distintos modelos de cultivo.

2.1.2. A nivel nacional

Guillén (2018) demostró que el factor de crecimiento similar insulínico tipo (IGF-1) a una concentración de 10 ng/ml, alcanzando una efectividad del 61,81% en el desarrollo ovocitario extracorpóreo de alpacas; por el contrario, el empleo del factor de crecimiento epidérmico (EGF), a concentración de 50 ng/ml llegó a tener una tasa de 52,28 %, finalmente el autor llegó a la conclusión de que el IGF-1 tiene mejor efecto frente al EGF, esto sobre la maduración in vitro del ovocito de alpaca. Por otro lado, (Huanca & Huanca, 2022) evaluaron la influencia de los factores embriotróficos EGF e IGF-1 y distintos niveles de oxígeno en el desarrollo in vitro de ovocitos de alpaca hasta alcanzar la fase de blastocisto. Los resultados indicaron que la adición de IGF-1 bajo una tensión de oxígeno del 6%, favoreció significativamente la producción de blastocistos, alcanzando una tasa del 18,4%, lo que indica que el IGF-1, bajo

condiciones de oxigenación reducida, favorece el desarrollo embrionario in vitro en esta especie.

Cabe resaltar que en un estudio sobre la relación del IGF-1 con la gestación en marranas, Piscoya (2024) destacó la importancia de los niveles de energía metabólica y su asociación con la producción de IGF-1. Se observó que una alimentación adecuada antes del apareamiento influye en la producción de IGF-1, lo que a su vez repercute en el tamaño de la camada. Aunque el estudio se centró en la gestación, resalta la relevancia del IGF-1 en la reproducción porcina.

En otro estudio, Guillén (2017) analizó el impacto de determinados factores de crecimiento en la maduración de ovocitos de alpaca, encontrándose que la suplementación del medio in vitro con IGF-1 a una concentración de 10 ng/ml permitió alcanzar una tasa de maduración del 61,81 % mientras que a 50 ng/ml fue del 50,28%. Estos hallazgos sugieren que concentraciones más bajas de IGF-1 pueden ser más efectivas en la maduración in vitro de ovocitos de alpaca.

2.2. Base teórica

2.2.1. Fisiología de la reproducción porcina

2.2.1.1. El ovocito

Se define al ovocito como la unidad reproductiva femenina que se desarrolla en los folículos ováricos, al madurar, se convierte en la base para la formación del cigoto mediante la unión con el espermatozoide (Byskov & Nielsen, 2003). Durante el desarrollo fetal se van formando los ovocitos, estos se encuentran dentro de los folículos primordiales (Rodríguez, 2013).

La cantidad de folículos primordiales en la especie porcina al nacimiento se ha estimado en cientos de miles por ovario, aunque esta cifra puede variar según la metodología y la fuente (Moor et al., 1990).

2.2.1.2. Crecimiento del folículo y el ovocito

Desde el instante en que sale de la reserva de folículos generados durante la ovogénesis, hasta que es liberado mediante la ovulación o sufre atresia (Abramovich et al., 2014).

Durante la vida fetal se forma el folículo primordial, compuesto por un ovocito rodeado de células planas que luego se vuelven cúbicas y crean varias capas. Estas células, llamadas pre-granulosa, transforman el folículo en primario, inhibiendo la meiosis del ovocito y favoreciendo la mitosis, lo que incrementa su tamaño (Palma, 2007). El ovocito, en asociación con las células de la pre-granulosa, constituye microentornos foliculares donde tiene lugar el depósito de una sustancia que, posteriormente, será denominada zona pelúcida (Moor et al., 1990).

Cuando el folículo primario pasa a secundario, se forma la zona pelúcida, que protege al ovocito y al futuro embrión (Van den Hurk & Zhao, 2005). En esta fase, las células de la pre-granulosa se transforman en granulosa, incrementando su número y organizándose en estructuras como el cúmulo y la teca (Abramovich et al., 2014).

La FSH estimula una mayor proliferación de las células de la granulosa, lo que genera la aparición de espacios que se llenan de fluido folicular. A medida que aumenta el volumen de este fluido, los espacios

confluyen y forman el antro, dando lugar a la cavidad antral (Motlik et al., 1984).

Tras la aparición del antro folicular, el folículo secundario evoluciona a la etapa de folículo terciario o de Graaf, caracterizado por un rápido crecimiento. En este estadio, el ovocito se sitúa en un extremo, envuelto por una capa de células de la granulosa, cuya disposición da lugar al complejo cúmulo-ovocito, cuya función es protegerlo y sostenerlo (Hafez & Hafez, 2002).

En este estado, el ovocito completa la primera división meiótica y, tras la ovulación, permanece detenido en metafase II, aún rodeado por las células del cúmulus (Buccione et al., 1990). El reinicio de la segunda meiosis ocurre únicamente después de la penetración del espermatozoide, con el objetivo de alcanzar el número haploide de cromosomas y fusionarse con el material genético paterno, lo que dará inicio al desarrollo de un nuevo individuo (Tarazona, 2010).

2.2.1.3. Maduración del ovocito

La maduración del ovocito implica cambios en el citoplasma y núcleo que permiten la fecundación y el desarrollo embrionario (Hafez & Hafez, 2002). Este proceso es inducido por el aumento preovulatorio de gonadotropinas, donde la LH provoca modificaciones en la esteroidogénesis y en el complejo cúmulo-ovocito (Senger, 1999). El AMPc es clave en la maduración nuclear, pues su incremento reinicia la meiosis. Aunque mantiene el arresto meiótico al transferirse al ovocito desde las células de la granulosa, su concentración aumenta con la acción de la LH, lo que reactiva la meiosis (Gilula et al., 1978).

Para que se produzca la maduración del ovocito debe de haber maduración nuclear y maduración citoplasmática (Hafez & Hafez, 2002).

Maduración nuclear: Empieza desde el primer arresto nuclear hasta el segundo arresto, es decir, en este periodo se va desarrollando la primera metafase de la meiosis, seguida de la formación del primer cuerpo polar, dando lugar a la segunda metafase y su posterior arresto meiótico (Richard, 2007).

En las hembras al nacimiento tienen sus ovocitos en la profase I una vez que las hembras entran en la pubertad por pico de la LH se reactiva la meiosis (Mermillod et al., 1999), para alcanzar la metafase II los cromosomas se condensan, una vez terminada la profase I hay “rotura de la vesícula germinal” para así llegar a la metafase I donde los cromosomas se encuentran unidos por los extremos, mientras que en la anafase I los cromosomas se distancian con dirección a su respectivo polo, en la telofase los cromosomas ya llegan a los polos, luego de esto el ovocito se encarga de expulsar el primer cuerpo polar, para luego continuar con la meiosis II pero, sólo llegara hasta metafase II porque hay un segundo arresto meiótico, ocurre la ovulación, y con el espermatozoide es que se reanuda la meiosis II (Betancourt et al., 2003).

Maduración citoplasmática: Durante esta etapa, el ovocito se prepara para albergar al embrión mediante la síntesis y almacenamiento de macromoléculas. A diferencia de las células somáticas que se dividen, el ovocito permanece en arresto nuclear y no avanza a la metafase desde G2 (Colazo & Mapletoft, 2017). Las células foliculares le brindan apoyo metabólico para mantener este estado (Thibault et al., 1987). En el citoplasma, las mitocondrias y gránulos corticales experimentan una

redistribución específica durante la maduración. Tras la ruptura de la vesícula germinal, las mitocondrias se concentran en la región perinuclear (Moor et al., 1990), mientras que los gránulos corticales migran hacia la periferia para formar una monocapa que evita la polispermia (Cran & Cheng, 1986).

2.2.1.4. Ovulación

La ovulación se produce cuando el folículo maduro se rompe debido al deterioro de su pared celular, liberando el óvulo (Marinone et al., 2018). La acción de proteasas generadas por las células de la granulosa degrada la pared y la membrana basal, lo que elimina las uniones celulares y deja al ovocito en contacto con el cúmulo ovígero. La expulsión del complejo ovocito ocurre por la ruptura del folículo y el aumento de la presión interna (Griffin & Ojeda, 2000).

Por otro lado, en cada estro la cerda produce hasta 25 óvulos, pero un promedio normal vendría a ser alrededor de 16 a 20 óvulos, sin embargo, de esta cantidad la hembra sólo alcanza a parir entre 10 a 12 lechones porque no todos los óvulos llegan a ser fecundados (Moor et al., 1990).

Si el celo dura 48 h, la ovulación ocurrirá entre 18 y 36 horas después de su iniciación, en los celos que duran 62 horas, tiene lugar a las 54 horas, en promedio la ovulación es tipo espontánea y se produce 36 horas después de comenzar el celo, todo este proceso ovulatorio suele durar 2 horas en promedio (Pinheiro, 1973).

El óvulo se expulsa acompañado de las células de la granulosa, llamadas corona radiada. La ovulación depende del pico de LH, estimulado por altos niveles de estrógenos. Esta hormona genera una reacción inflamatoria en granulosa y teca, donde se produce edema y separación de fibras colágenas (Filipiak et al., 2016). El estrógeno también regula la producción hipotalámica de LH. Antes de la ovulación, tanto LH como FSH aumentan, causando la rápida expansión del folículo (Hall & Guyton, 2016).

La LH induce la luteinización de las células foliculares (teca y granulosa), convirtiéndolas en las principales fuentes de progesterona. Así, la ovulación ocurre gracias al rápido crecimiento del folículo, la reducción del estrógeno y el inicio de la secreción de progesterona, todos ellos regulados por el pico de LH (Hall & Guyton, 2016).

La elevada producción de LH por la adenohipófisis estimula la síntesis de hormonas esteroideas foliculares que contienen progesterona para luego dar paso a dos cosas sumamente importantes para la ovulación (Filipiak et al., 2016). La teca externa libera enzimas proteolíticas provenientes de lisosomas, encargadas de degradar la pared de la cápsula folicular y de provocar la hinchazón del folículo, y degenerando el estigma (Espey, 1974), mientras tanto aumenta de forma acelerada el tamaño de los vasos sanguíneos de la pared folicular, de igual forma se van secretando las prostaglandinas que se encargarán de la vasodilatación en los tejidos foliculares, esto hace que dentro del folículo haya producción del plasma ocasionando la hinchazón del folículo (Hall & Guyton, 2016).

Entonces para que se presente la ovulación se necesita de la degeneración del estigma y la tumefacción del folículo para generar la

rotura del folículo (Griffin & Ojeda, 2000) y seguidamente la expulsión del ovocito (Marinone et al., 2018).

2.2.2. Maduración *in vitro*

La técnica de maduración *in vitro* se aplica en laboratorio a ovocitos inmaduros, tanto nuclear como citoplasmáticamente (Herrera & Jara, 2009). Estos se colocan en medios de maduración hasta alcanzar la metafase II, fase en la que el citoplasma adquiere la competencia necesaria para la fertilización y la embriogénesis temprana. (Abeydeera et al., 2000).

Tanto la maduración citoplasmática como nuclear no ocurren al mismo tiempo, sin embargo para que sincronicen estos procesos se hace uso de suplementos en los medios de cultivo de MIV como el inhibidor de síntesis proteica como cicloheximida, con la adición de este suplemento se retrasa la maduración nuclear para sincronizar con la maduración citoplasmática, asimismo, contribuye a que los ovocitos alcancen con éxito la etapa de blastocisto tras la fecundación. (Ye et al., 2005).

Para lograr la MIV de ovocitos porcinos se utilizan medios de cultivo a base de suero fetal bovino (SFB) y fluido folicular porcino (FFp) como: medio de cultivo celular TCM-199, una variante modificada de la solución Tyrode enriquecida con lactato y piruvato. (Petters & Wells, 1993).

El tiempo de maduración *in vitro* del ovocito porcino varía entre 36 y 48 horas, Yamauchi et al. (1996) señalan que lo ideal es entre 42 y 44 horas, en cuanto a la temperatura para la incubación se utiliza como referencia la temperatura corporal del porcino que viene a ser 39°C, Kobayashi et al. (2006) utilizó 39,8 °C, (Zheng & Sirard, 1992) 39 °C, Chong

et al., (2018) 38.5 °C; por otro lado, la humedad es de 99 % y el CO₂ es de 5 % (Kobayashi et al., 2006; Chong et al., 2018; Lino et al., 2021).

2.2.2.1. Método de recuperación de los ovocitos

Aspiración folicular

Bustamante (2008) menciona que para la práctica de este método sólo se puede punzar folículos antrales que sobrepasen los 3 mm, estos se alcanzan a ver en la superficie ovárica de hembras adultas; la desventaja es la pérdida de células del cúmulo que ocurre durante el procedimiento, por esto que los COC recuperados son menores que en otras técnicas.

Disección folicular

Mediante esta técnica, se recupera una gran cantidad de complejos cúmulo-ovocito (COC) por ovario. Sin embargo, la población ovocitaria presenta una notable heterogeneidad, lo que exige una selección rigurosa de los COC. A pesar de ello, es el método más empleado para extraer ovocitos de ovarios de hembras prepúberes, dado que el tamaño reducido de los folículos dificulta el uso de la punción (Fernández et al., 2010).

Slicing (cortes de la superficie ovárica)

En caprinos, Romaguera et al. (2010) identificaron que la recolección de ovocitos por medio del fraccionamiento tisular del ovario (slicing), en comparación con la aspiración folicular, reduce de manera significativa los niveles de apoptosis tanto en fases tempranas como en fases tardías en los COC inmaduros. Asimismo, Martino et al. (1994) señalaron que La técnica de slicing optimiza el rendimiento de la recolección, permitiendo

recuperar un volumen superior de ovocitos por ovario en comparación con las técnicas de disección o aspiración.

2.2.2.2. "Parámetros de evaluación para la clasificación de los complejos cúmulos-ovocito (COCs)."

La selección adecuada de los COCs es fundamental para la maduración de los ovocitos. Los ovocitos se categorizan en función de la densidad de su cúmulus oóforo; el grado A se asigna a aquellos con más de tres estratos celulares, presencia de pedúnculo y un citoplasma de apariencia uniforme; B, dos o tres capas sin pedúnculo pero con citoplasma homogéneo y cúmulos compactos; C, desnudos con citoplasma heterogéneo; y D, con cúmulo expandido (Lonergan & Fair, 2008).

Según Nagashima et al. (1996), la apariencia del citoplasma del ovocito, que puede ser uniforme o variado, juega un papel importante en la selección de los COCs. Su estudio demostró que, tras la inyección subzonal de espermatozoides, los blastocistos mostraron un desarrollo preferente cuando el citoplasma era heterogéneo en comparación con el homogéneo.

Los ovocitos con membrana citoplasmática lisada no son aptos, ya que están alterados, por tal, son eliminados (Nohalez, 2018). Para la MIV se seleccionan cúmulos intactos, rodeando completamente al ovocito (Lorenzo et al., 2019).

2.2.2.3. Medios de maduración

Para llevar a cabo la maduración in vitro, se han implementado múltiples sistemas de cultivo, entre los que figuran el Ham's F-10, Ham's F-

12, NCSU-37 y el Krebs Ringer Bicarbonato modificado, además del TCM-199, Tyrodes y Waymouth MB752/1 (Guillén, 2018). En porcinos se emplean Whitten's, KRB y NCSU (Funahashi et al., 1997). Entre los medios más avanzados destacan TCM-199 y Waymouth (Zheng & Sirard, 1992).

En porcinos se ha utilizado el medio de maduración NCSU-37. El medio NCSU-37 (North Carolina State University-37) se utiliza ampliamente en la maduración in vitro de ovocitos porcinos debido a su composición específica, principalmente por cloruro de sodio (108,73 mM) y bicarbonato de sodio (25,07 mM) para el control osmótico y del pH. Se añadieron fuentes energéticas como glucosa (5,55 mM) y D-sorbitol (12,00 mM), además de suplementos antibióticos (Penicilina G y Estreptomicina) para garantizar la esterilidad del proceso de maduración (Yoshida et al., 1990).

La suplementación del medio incluyó precursores antioxidantes como la cisteína y el beta-mercaptoetanol, junto con insulina y el modulador dibutilil cAMP. El soporte biológico y hormonal se completó mediante la adición de fluido folicular de origen porcino, además de las gonadotropinas PMSG y hCG, lo que potencia la maduración ovocitaria (Funahashi & Day, 1997). El NCSU-37 ha mostrado mayor efectividad que otros medios, con tasas de maduración nuclear del 85,9% y formación de cuerpos polares del 81,9%, superando al NCSU-23 y a medios con EGF (Pyoos et al., 2018). Su formulación proporciona condiciones ideales para el desarrollo nuclear y citoplasmático, mejorando la fertilización y el desarrollo embrionario. Además, la inclusión de 10% de fluido folicular porcino (PFF) incrementa la penetración espermática y estimula la maduración ovocitaria (Yoshida et al., 1990).

Incluso se ha utilizado para la MIV de ovocitos de bovinos el Minitube® (MMO Minitube®), este medio se prepara 2 horas antes de la aspiración, con 9 mL de la solución stock de Minitube MMO 19990/0010® más la adición de 1 mL de Suero de Vaca en Celo, 100 µl de FSH y 50 µl de LH. Para llevar a cabo la maduración, se colocan 50 µl de medio de cultivo cubiertos con aceite mineral en una placa Petri, seguidamente se coloca en incubadora con 5 % de CO₂ y 38,5 °C de temperatura, una vez seleccionados los ovocitos son agregados donde corresponde:, 1 ovocito por 10ul de MMO Minitube, finalmente se vuelve a colocar en la incubadora por un periodo de 24 horas, 5 % CO₂, temperatura de 38,5 °C y humedad 95 % donde se dará lugar a la maduración *in vitro*, sin embargo el porcentaje de maduración que obtuvo fue de 75,55 % mientras que TCM-199 Parker fue de 87,13 % (Lino et al., 2021).

El TCM-199 (Medio de cultivo celular)

El Tissue Culture Medium (TCM) es un medio de cultivo ampliamente utilizado en biotecnología reproductiva para el cultivo y maduración de células, incluidos ovocitos y embriones. Este medio contiene una mezcla equilibrada de nutrientes esenciales, como sales, vitaminas, aminoácidos y fuentes de energía como glucosa y piruvato (Baker & Anderson 2005). Además, se puede complementar con factores adicionales, como suero fetal bovino (SFB), hormonas (FSH, LH), antioxidantes y antibióticos, para optimizar las condiciones de crecimiento celular y prevenir contaminaciones (Garrido & Fernández 2010). La composición exacta del TCM puede ajustarse según las necesidades del experimento, proporcionando un entorno adecuado para mantener la viabilidad y funcionalidad de las células cultivadas (Senger, 1999).

El TCM-199 modificado (Sigma) se usa para madurar ovocitos porcinos, suplementado con glucosa, piruvato de sodio, cistina, EGF y kanamicina para energía, metabolismo, síntesis proteica, calidad ovocitaria y prevención de contaminación (Garrido & Fernández 2010). Los AOC se lavan, seleccionan y cultivan en placas de 4 pocillos con 500 µl de medio MIV a 39.8°C, humedad saturada y 5 % CO₂. Se incuban 22–24 h con PMSG y hCG, luego se lavan y continúan 19–22 h en medio sin hormonas (Kobayashi et al., 2006).

Chong et al. (2018) utilizaron TCM-199 con bicarbonato, sales de Earle, PVA (0,1 %), cisteína (0,57 mM), glucosa (3,05 mM), piruvato de sodio (0,91 mM) y EGF de glándula submaxilar de ratón (10 ng/mL). En gotas de 500 µL se colocaron 30–35 ovocitos junto con FSH y LH porcinas (0,5 µg/mL), incubados 48 h a 38,5 °C, 5 % CO₂ y humedad saturada.

Un estudio empleó TCM-199 como base de maduración, complementado con 10 % de SFB inactivado, piruvato (0,3 mM), glucosa (1 mM), penicilina (100 UI/mL) y estreptomicina (100 mg/mL). El medio fue esterilizado con filtros Millipore de 0,22 mm y equilibrado 24 h antes de su uso. Las condiciones de cultivo consistieron en un periodo de incubación de 22 horas a 38,5 °C, bajo condiciones de humedad constante (saturación), manteniendo los niveles de dióxido de carbono fijos en un 5%. (Wen et al. 2020).

En un estudio con ovocitos ovinos se utilizó TCM-199 suplementado con SFB (10 %), penicilina (100 UI/mL), piruvato (0,3 mM), glucosa (1 mM), estreptomicina (100 mg/mL) y distintas concentraciones de FSH y LH. El medio se aplicó una capa de aceite mineral para cubrir las gotas de cultivo, El proceso de incubación se extendió por 22 horas, asegurando un entorno

térmico de 38,5 °C y una atmósfera controlada con una concentración de dióxido de carbono al 5 %. (Gordon, 2003).

Un estudio sobre ovocitos ovinos empleó TCM-199 con 10 % de SFB, piruvato (0,3 mM), glucosa (1 mM), penicilina (100 UI/mL) y estreptomicina (100 mg/mL), suplementado con FSH y LH en diferentes concentraciones y cubierto con aceite mineral. Se mantuvo la homeostasis del cultivo durante un periodo de 22 horas, empleando una atmósfera saturada de humedad y una concentración controlada de CO₂ al 5 % a 38,5 °C. La mejor concentración fue 2.5 mg/L de FSH, con 45,4 % de MIV, aunque se registraron numerosos ovocitos degenerados y baja maduración, recomendándose el uso de factores de crecimiento (Cognié et al., 2004).

2.2.3. Antioxidantes de la producción in vitro

Los espermatozoides y ovocitos cuentan con defensas antioxidantes naturales contra las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Du Plessis et al., 2008). Sin embargo, los medios de cultivo embrionario in vitro generan gran cantidad de EROs (Romero et al., 2008). Para reducirlos, se emplean antioxidantes como albúmina y ácido ascórbico, que mejoran la producción de blastocistos (Vásquez et al., 2014). El ácido ascórbico neutraliza radicales acuosos, al igual que el beta-mercaptoetanol (Feugang et al., 2004). También se ha usado extracto de té verde en ovocitos madurados in vitro, aumentando la tasa de blastocistos (Wang et al., 2007).

La evidencia científica sugiere que suplementar los medios de producción *in vitro* con antioxidantes contrarresta el daño oxidativo, al disminuir las EROs, lo que mejora la maduración citoplasmática, eleva los

niveles de GSH y aumenta la supervivencia de blastocistos en bovinos (Zhao et al., 2018).

Beta-mercaptoethanol (B-ME)

El Beta-mercaptoethanol es un antioxidante que pertenece al grupo tiol, las proteínas que contiene son pieza clave en el estrés oxidativo (Matos & Furnus, 2000) para reducir el envejecimiento del ovocito y el desgaste del citoplasma (Gupta et al., 2010).

Gupta et al. (2010) comprobó que bajo la suplementación de este antioxidante se logra obtener un mayor desarrollo post fecundación in vitro. Asimismo, Hashen et al. (2006) demostró que el uso del beta-mercaptoethanol protege al embrión del estrés oxidativo y promueve el desarrollo antes de la implantación de embriones.

Choe et al. (2010) señalaron que el uso de β -mercaptoetanol en ovocitos porcinos incrementa la síntesis de glutatión, mejorando la maduración citoplasmática y el desarrollo embrionario. Abeydeera et al. (1998) obtuvieron resultados similares al emplear este tiol en medios con cisteína, elevando la GSH y favoreciendo el desarrollo embrionario. Panka et al. (2015) confirmaron estos hallazgos en ovocitos de búfala, donde el antioxidante aumentó la GSH, promovió la maduración meiótica y protegió contra el daño oxidativo.

Merlo et al. (2016) encontraron que el β -mercaptoetanol no fue eficaz en la MIV de ovocitos ni en el desarrollo embrionario temprano de equinos, incluso a concentraciones de 0,1 y 0,7 mM. Por el contrario, Kobayashi et al. (2006) demostraron que tanto la cisteamina como el β -mercaptoetanol

(100 mM) en medios de maduración de ovocitos porcinos favorecen la formación de blastocistos.

2.2.4. Factores de crecimiento y uso en la producción in vitro.

Los factores de crecimiento son clave en la maduración in vitro de células reproductivas. El PDGF y el IGF-I favorecen la viabilidad y maduración en cabras (Zhang et al., 2008). El IGF-II aumenta la fertilización en ovocitos porcinos, y el EGF optimiza la maduración en bovinos y porcinos, promoviendo un mejor desarrollo embrionario (Funahashi et al., 1997; Romero et al., 2008).

Factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I)

El IGF-I promueve el crecimiento y multiplicación celular (Hafez & Hafez, 2002). Se produce principalmente en el hígado, aunque también en el hipotálamo, ovarios, oviductos y útero (Sienes et al., 2022). Su síntesis se relaciona con el folículo dominante y las células de la teca (Ginther et al., 1996; 2001), estimulada por el aumento de LH tras la caída de FSH. Los receptores de IGF-I en células de la granulosa explican su acción sobre la división celular. Además, el IGF-I contribuye a un ambiente favorable en el oviducto, promoviendo la secreción de proteínas que facilitan la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Lenz et al., 2007)

El IGF-I es fundamental debido a su efecto positivo en las células ováricas, ya que estimula la esteroidogénesis, la proliferación celular y promueve el desarrollo del ovocito (Lenz et al., 2007). Además, se ha relacionado con el desarrollo del blastocisto y la supervivencia del embrión (Kocyigit & Cevik, 2015; Lenz et al., 2007). Las investigaciones también han

demostrado que la adición de IGF-I en medios de maduración contribuye a obtener altas tasas de supervivencia de los ovocitos, lo que a su vez mejora los porcentajes de preñez tras la transferencia embrionaria (Block & Hansen, 2007).

Según Pereira et al. (2019), la adición de 100 ng de IGF-I mejora la supervivencia de ovocitos porcinos vitrificados. Guillén (2018) determinó que el IGF-I supera al EGF en la maduración y desarrollo embrionario *in vitro* de alpacas, recomendando 50 ng/ml como concentración ideal para MIV y FIV.

Igualmente, Guilherme et al. (2013) llegó a la conclusión de que al agregar el IGF-I junto al SF a la maduración *in vitro* y la fertilización *in vitro* trae consigo mayor tasa de maduración y con el uso de ambos se pueden obtener buenos resultados para la FIV.

Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF)

"El EGF se aplica en medios de maduración ovocitaria y ha mostrado efectos positivos (Esquirol & Herrero, 2017). En la MIV, actúa como un catalizador para la reanudación de la meiosis (identificada por la ruptura de la vesícula germinal), la expansión del cúmulo y la progresión de la maduración del núcleo (Salgado & Vergara, 2013).

Además, se ha observado que el EGF reduce la poliespermia, favorece la penetración monoespérmica, facilita la formación del pronúcleo masculino tras la penetración espermática, y estimula tanto la división celular como el desarrollo embrionario (Kenkistepe et al., 1995).

2.2.5. Tinción

En el trabajo de Aponte et al. (2010) se evaluó la progresión de la meiosis en ovocitos bovinos. Para ello, los complejos cúmulo-ovocito (COC) fueron desprovistos de células mediante tratamiento con hialuronidasa (1 mg/ml, p/v) durante 2 minutos. Se utilizó una solución de 1 µg/ml (p/v) de Hoechst 33342 (Sigma) para teñir los ovocitos y proceder con su evaluación nuclear que tuvo una duración de 10 minutos. y se examinaron bajo un microscopio invertido de fluorescencia.

Del mismo modo procedió Do et al. (2015) observaron a través de microscopía de fluorescencia las diferentes fases de la maduración nuclear del ovocito de porcinos peripuberales para esto primero desnudaron los ovocitos que estaban fijados en PBS suplementado con 3,7 % (p/v) de paraformaldehído y 1 % (v/v) de Triton. X-100 a temperatura ambiente durante 15 minutos, seguidamente se colocaron los ovocitos en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con bisbencimida 1,9 mM (Hoechst 33342; Sigma-Aldrich) antes de cubrirlos con cubreobjetos después se colocaron en incubadora, finalmente se observó en un microscopio de fluorescencia.

2.3. Conceptos Básicos

Adenosina monofosfato cíclico (AMPc): Este elemento interviene como regulador negativo en la maduración del ovocito, la transición hacia la maduración del núcleo se origina tras la modulación de las vías de

señalización del AMPc presentes en las células de la granulosa. (Chong et al., 2018).

Antioxidante: Se encarga de retrasar la oxidación, protegiendo de las especies reactivas (Romero et al., 2008).

Beta-mercaptoethanol (BMC): Es un antioxidante perteneciente del grupo tiol, en la MIV reduce el envejecimiento del ovocito y desgaste del citoplasma (Gupta et al., 2010).

Complejo cúmulos (COCS): se encarga de rodear al ovocito para protegerlo hasta su maduración (Nagashima et al., 1996).

Corpúsculo polar: Se produce a partir de la ovogénesis, aparece luego de la ovulación, es decir al terminar la primera meiosis aparece el corpúsculo o cuerpo polar (Griffin & Ojeda, 2000).

División celular: Se trata de la división celular cuyo resultado es la formación de células hijas a partir de una célula madre (Alvarado & Mayani, 2007).

Especies reactivas de oxígeno (EROs): Son resultado de la fisiología normal y del metabolismo aeróbico, su desbalance causa disfunción y daño celular (Pourova, 2010).

Estrés oxidativo: Se produce cuando hay niveles altos de EROs, ocasionando la apoptosis (Tarazona, 2010).

Factor de crecimiento: En el contexto folicular, actúa modulando la función de las gonadotropinas, impulsando la síntesis de ADN y promoviendo la ruptura de la vesícula germinal, lo que conduce al reinicio del proceso meiótico (May et al., 1988).

Fluido folicular: Rodea al ovocito y se encarga de su nutrición, en la maduración *in vitro* se utiliza como medio capacitante (McNutt & Killian, 1991).

Maduración nuclear: Se refiere al desarrollo del núcleo, que implica la descomposición de la envoltura nuclear hasta la primera metafase, posteriormente la extrusión del primer corpúsculo polar y la posterior estabilización del ovocito en el estadio de metafase II. (Richard, 2007).

Meiosis: En el ovocito primario ocurre la división por meiosis I pero se detiene en estado de profase y se le conoce como “arresto nuclear” o “periodo diploteno” pero instantes previos de la ovulación es que un ovocito reanuda la meiosis, se forma la segunda célula y se expulsa el primer cuerpo polar, luego inicia la meiosis II y llega hasta metafase II ocurre la ovulación y se vuelve a pausar hasta que el espermatozoide reanuda la meiosis al entrar en el ovulo ocasionando la división celular (Tarazona, 2010).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Material

3.1.1. Ubicación geográfica

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de biotecnología reproductiva animal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, en Tacna, Perú. La universidad se localiza a 18°01'30"S y 70°14'59"O, a una altitud de aproximadamente 550 m s.n.m. Tacna, ubicada en la costa sur del Perú, se caracteriza por un clima cálido, con temperaturas de 24–30 °C en verano y 15–25 °C en invierno. Los ovarios porcinos utilizados fueron recolectados en el Camal Municipal "Mario Reynoso Eyzaguirre Yáñez", en el distrito de Calana, con coordenadas 17°59'38"S y 70°14'22"O. Las condiciones geográficas y climáticas de la región brindaron un entorno adecuado para la investigación.

3.1.2. Población y muestra

En base al estudio piloto del camal municipal de Tacna "Mario Reynoso Eyzaguirre Yáñez" del mes de noviembre del 2023 se han registrado 1 320 porcinos beneficiados (Camal Municipal de Tacna, 2023).

El estudio empleó un muestreo probabilístico en poblaciones finitas (N=1320). Se incluyeron cuatro tratamientos, con un tamaño de efecto esperado de 0,4, correspondiente a una diferencia moderada entre medias, siguiendo las recomendaciones de Cohen (1988). La selección de este

valor buscó asegurar la sensibilidad del análisis para detectar diferencias de magnitud intermedia. Además, se definió un poder estadístico de 0,8, estándar en la investigación científica, que otorga un 80 % de probabilidad de identificar diferencias verdaderas entre tratamientos y reduce la posibilidad de cometer un error tipo II.

A partir de estos parámetros, y considerando la población finita, se determinó que un tamaño de total de 76 gorrinas, distribuidas en 19 animales por tratamiento, era suficiente para detectar diferencias significativas. El tamaño de la muestra se calculó mediante la función `pwr.anova.test` en el software R, versión 4.3.1.

Para evaluar las diferencias entre tratamientos en los parámetros analizados, se empleó un ANOVA de una vía. Dado que los datos no seguían una distribución normal y presentaban heterocedasticidad (varianza no constante), se implementaron pruebas no paramétricas correspondientes.

Para realizar la corrección de poblaciones finitas se utilizó la siguiente fórmula:

$n_o = 18,04$, redondeo al inmediato superior $\rightarrow 19$

$$n = \frac{1}{\frac{1}{n_o} + \frac{1}{N}} = \frac{1}{\frac{1}{19} + \frac{1}{1320}} = 18,7 \text{ redondeo al inmediato superior } 19$$

Se utilizó en total 76 gorrinas.

3.1.3. Materiales

Equipos de laboratorio:

- Microscopio de contraste de fases
- Baño María.
- Incubadora de CO₂
- Platina térmica
- Microscopio invertido
- Balanza analítica
- Centrífuga

Material de laboratorio:

- Jeringas de 10 ml
- Aguja N°21
- Placas Petri
- Placa de 4 pocillos
- Micropipetas de 10 µl
- Micropipetas de 100 µl
- Micropipetas de 200 µl
- Micropipetas de 1000 µl
- Laminillas
- Puntillas

Reactivos e insumos químicos para maduración in vitro:

- Bicarbonato de sodio
- Lactato de sodio
- Glucosa

- Cafeína
- Cloruro de potasio
- BSA
- Antibiótico estreptomicina

Para la tinción:

- Hialuronidasa
- Tinción Hoechst 33342

3.2. Método

3.2.1. Tipo de investigación

Experimental. La investigación se caracterizó por la manipulación planificada de las variables, con el propósito de evaluar sus efectos dentro de un entorno controlado (Arainga, 2011).

3.2.2. Nivel de investigación

Explicativa. Este enfoque investigativo se propone identificar las causas fundamentales de los fenómenos físicos, intentando esclarecer por qué acontece un fenómeno y en qué circunstancias se presenta. Su propósito es proporcionar una comprensión detallada de cómo, cuándo, dónde y por qué se produce un evento (Arainga, 2011).

3.2.3. Diseño de la investigación

El diseño de la investigación es cuantitativo, lo que implica que se realiza un análisis numérico para responder a la pregunta o hipótesis planteada en el estudio (Sousa et al., 2007).

Diseño experimental

Los ovarios seleccionados fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro tratamientos, correspondiendo ovarios de 19 gorrinas para cada uno. Los ovocitos fueron cultivados en medio específico para su maduración; en el tratamiento 01 se adicionó IGF-1, en el tratamiento 02 se incorporó β -ME, en el tratamiento 03 se empleó TCM suplementado con IGF-1 y β -ME, finalmente, el tratamiento sin adición fue considerado como control. En todos los tratamientos se determinó el promedio y el error estándar. La etapa de desarrollo de los ovocitos se evaluó mediante tinción con Hoechst 33342, considerando como ovocitos madurados aquellos que alcanzaron la metafase II. Los resultados obtenidos se presentaron en forma de porcentajes y error estándar. El diseño metodológico correspondió a un estudio experimental, en el que se analizaron cuatro tratamientos con el objetivo de maximizar la tasa de maduración de ovocitos. Los datos se organizaron en tablas y gráficos, expresados como medias junto con su error estándar.

3.2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Técnicas de recolección de datos

a) Recuperación de COCs de ovarios obtenidos post mortem

- Los ovarios obtenidos de 76 gorrinas beneficiadas fueron disecados y conservados en un termo con solución fisiológica a 25 °C, para luego ser transportados al laboratorio y lavados con solución fisiológica a 37 °C. La recuperación de los complejos cúmulo-ovocito (COCs) se efectuó a través de la aspiración de folículos antrales con un rango de tamaño situado entre 3 y 5 mm, utilizando una jeringa

de 10 mL con aguja N.º 21. Los COCs se clasificaron atendiendo al aspecto del citoplasma y de las células del cúmulo que los rodeaban.

Categoría de COCs:

- Categoría de A; que incluyó ovocitos revestidos por más de tres estratos de células y una matriz citoplasmática uniforme.
- Categoría de B; definido por una cobertura de dos a tres capas celulares junto con un ooplasma de apariencia irregular.
- Categoría de C; COCs sin capas parcial o totalmente y citoplasma heterogéneo.
- Categoría de D; las células de cúmulos están expandidas.

b) Maduración in vitro

Se recolectaron exclusivamente COCs caracterizados por poseer diversas hileras de células del cúmulo compactas, asegurando que el citoplasma presentara una distribución homogénea; estos ejemplares fueron posteriormente cultivados en medio TCM-199, enriquecido con cisteína (0,57 mM), AMPc (1 mM), FSH (5 µg/mL), LH (5 µg/mL) y antibiótico, conforme al tratamiento establecido.:

- T1: TCM + 100 ng IGF-1
- T2: TCM + 50 µM β-ME
- T3: TCM + 100 ng IGF-1 + 50 µM β-ME
- T4: TCM sin adición (control)

La maduración se llevó a cabo durante un periodo de 46 horas en una incubadora bajo condiciones controladas de 5 % de CO₂, temperatura de 39,0 °C y 99 % de humedad relativa. Los ovocitos fueron registrados según tratamiento, número de pocillo, número de COCs, hora de inicio de

la maduración in vitro, fecha y hora de evaluación, así como la presencia de ovocitos degenerados o cuerpos polares.

c) Tinción de Ovocitos

Finalizado el periodo de cultivo, se determinó el progreso meiótico de los gametos mediante la eliminación de las células del cúmulo. Los ovocitos resultantes se tiñeron con Hoechst 33342 (1 µg/mL en PBS) por un lapso de 30 minutos a temperatura ambiente, lavándose posteriormente para su análisis bajo microscopio de fluorescencia. El estado nuclear se categorizó según el patrón cromatínico en: vesícula germinal (VG), metafase I (MI), anafase I, metafase II (MII) o estado degenerado (D)

3.2.5. Método de análisis de datos

El procesamiento y análisis de la información recolectada se efectuó mediante el entorno estadístico R (R Core Team) (versión 4.3.1). La normalidad de la muestra se comprobó a través del test de Shapiro-Wilk, empleando de forma complementaria la prueba de Levene para constatar la homogeneidad de las varianzas. Una vez validados estos supuestos, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) con el fin de determinar la influencia de los tratamientos en la maduración de los ovocitos.

En el caso de las comparaciones bivariadas, la elección de la técnica estadística dependió de la naturaleza de los datos; se utilizó la t de Student para distribuciones normales, mientras que para aquellas muestras que no cumplieron este supuesto, se optó por el test de rangos con signo de Wilcoxon.

Del mismo modo, los resultados se presentaron a través de gráficos de barras confeccionados en Microsoft Excel, donde se ilustran los distintos tratamientos y sus respectivas fases, lo que permitió una mejor visualización y comparación de los efectos observados.

En todos los análisis se adoptó un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ (95 % de confianza), garantizando la solidez y fiabilidad de los resultados. De esta manera, cada prueba estadística aplicada desempeñó un propósito particular dentro del estudio, permitiendo una evaluación integral y consistente de los datos obtenidos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Resultados según los objetivos:

Evaluar el efecto del IGF-I y beta-mercaptoethanol en la maduración *in vitro* en ovocito de porcino, Tacna – 2024.

Tabla 1: *Resultados de estadios de maduración según tratamientos expresados en % (media $\pm$ error estándar).*

Tratamiento	n	Vesícula germinal	Anafase	Metafase I	Metafase II	Degenerados
Control	145	25,95 $\pm$ 1,09	8,78 $\pm$ 1,27	21,71 $\pm$ 0,54	18,20 $\pm$ 14,15	25,37 $\pm$ 0,88
Beta	133	19,64 $\pm$ 1,10	5,43 $\pm$ 0,72	30,58 $\pm$ 1,72	24,67 $\pm$ 0,79	19,68 $\pm$ 1,05
IGF-1	149	14,09 $\pm$ 0,62	5,51 $\pm$ 0,38	33,53 $\pm$ 1,34	17,30 $\pm$ 1,16	29,57 $\pm$ 1,11
B+IGF-1	148	13,87 $\pm$ 0,52	8,93 $\pm$ 11,91	34,94 $\pm$ 1,12	13,27 $\pm$ 0,35	28,98 $\pm$ 0,32

En la Tabla 1 los resultados están expresados como porcentaje medio $\pm$ error, se presentan los siguientes tratamientos: grupo control, β -mercaptoetanol (Beta), IGF-1, y la combinación de β -mercaptoetanol + IGF-1 (B+IGF-1) donde se comparan los porcentajes de ovocitos porcinos en diferentes estadios de maduración nuclear.

En primer término, se aprecia que el grupo control presenta la mayor proporción de ovocitos en la fase de vesícula germinal (VG) con un 25,9 %, seguido por los grupos Beta (19,6 %), IGF-1 (14,1 %) y B+IGF-1 (13,9 %). Este patrón indica que la aplicación de compuestos bioactivos disminuye el

número de ovocitos que permanecen en estadios inmaduros, favoreciendo su avance en el proceso meiótico.

Respecto a la fase de anafase, se registran porcentajes bajos y relativamente similares entre los grupos: 8,8 % en el control, 5,4 % con Beta, 5,5 % con IGF-1 y 8,9 % con B+IGF-1. Estos valores indican que pocos ovocitos se encuentran en este estadio transitorio, sin variaciones sustanciales atribuibles a los tratamientos.

En la etapa de metafase I, el grupo tratado con B+IGF-1 presenta el mayor porcentaje (34,9 %), seguido por IGF-1 (33,5 %) y Beta (30,6 %), mientras que el grupo control registra un porcentaje menor (21,7 %). Esta diferencia señala que todos los tratamientos promovieron de forma efectiva la progresión meiótica hasta metafase I, siendo más marcados los efectos del IGF-1 y su combinación con β -mercaptoetanol.

En contraste, en el estadio de metafase II, el mayor porcentaje se observa en el grupo Beta (24,7 %), seguido por el grupo control (18,2 %), el grupo IGF-1 (17,3 %) y finalmente el grupo B+IGF-1 (13,3 %). Estos resultados evidencian que el tratamiento con β -mercaptoetanol mostró la mayor proporción de ovocitos que alcanzaron metafase II, mientras que la combinación B+IGF-1 obtuvo el porcentaje más bajo. Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, podrían sugerir variaciones en la respuesta de los ovocitos según el tipo de tratamiento aplicado.

Finalmente, en cuanto a los ovocitos degenerados, los porcentajes obtenidos fueron: IGF-1 (29,6 %), B+IGF-1 (29,0 %), control (25,4 %) y, finalmente, el grupo Beta (19,7 %). Estos resultados evidencian que el tratamiento Beta fue el que presentó la menor proporción de ovocitos degenerados, lo que indica que este tratamiento podría ofrecer una mayor. En contraste, los tratamientos IGF-1 y B+IGF-1 mostraron los porcentajes más altos de degeneración

En conjunto, estos resultados evidencian que tanto el IGF-1 como el β -mercaptoetanol, individualmente o en combinación, promueven la maduración nuclear hasta metafase I, con el tratamiento combinado mostrando el porcentaje más alto en esta etapa. No obstante, el efecto sobre metafase II no fue concluyente, y la proporción de ovocitos degenerados en algunos grupos tratados sugiere la necesidad de ajustar las condiciones del medio de cultivo.

Determinación del efecto del IGF- 1 en la maduración nuclear in vitro en ovocitos de porcinos, Tacna – 2024.

Tabla 2 : *Resultados de estadios de maduración nuclear de Control vs IGF-1 expresados en % (media $\pm$ error estándar).*

Tratamiento	n	Vesícula germinal	Anafase	Metafase I	Metafase II	Degenerados
Control	145	25,95 $\pm$ 1,09	8,78 $\pm$ 1,27	21,71 $\pm$ 0,54	18,20 $\pm$ 14,15	25,37 $\pm$ 0,88
IGF-1	149	14,09 $\pm$ 0,62	5,51 $\pm$ 0,38	33,53 $\pm$ 1,34	17,30 $\pm$ 1,16	29,57 $\pm$ 1,11

Los resultados obtenidos sobre la maduración nuclear in vitro, comparando el efecto del IGF-1 frente al grupo control, se presentan en la Tabla 2, en la cual se evidenció un aumento en la proporción de ovocitos en Metafase I y ovocitos degenerados en el grupo tratado con IGF-1, mientras que se observó una disminución en los ovocitos en estadio de Vesícula Germinal (VG) y Anafase.

Se encontró que la proporción de ovocitos en vesícula germinal fue menor en el grupo tratado con IGF-1 (14,1 %) respecto al grupo control (26,0 %). Esta disminución indica que una mayor proporción de ovocitos tratados con IGF-1 dejó el estado inmaduro y avanzó hacia fases más desarrolladas de la maduración nuclear, en comparación con el control.

Por otro lado, en el estadio de Anafase, no se observaron diferencias marcadas entre ambos tratamientos. El grupo control presentó un 8,8%, mientras que el grupo IGF-1 mostró un valor ligeramente inferior (5,5%), lo cual podría indicar que el IGF-1 acelera el tránsito por esta fase.

Con respecto a Metafase I, se evidenció un incremento considerable en el grupo tratado con IGF-1 (33,5%) en comparación con el grupo control (21,7%), lo que sugiere un efecto positivo del IGF-1 en la promoción de la maduración nuclear hacia esta etapa.

En cuanto a Metafase II, los porcentajes fueron similares entre ambos grupos: 18,2% para el grupo control y 17,3% para el grupo IGF-1, mostrando una leve disminución en este último, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

Los ovocitos deteriorados fue algo más alta en el grupo tratado con IGF-1 (29,6%) respecto al grupo control (25,4%), lo cual podría sugerir un posible efecto adverso del IGF-1 sobre la viabilidad ovocitaria en determinadas condiciones.

Al comparar los distintos estadios de desarrollo nuclear, no se hallaron diferencias de relevancia estadística entre los tratamientos analizados ($P > 0,05$). Los datos específicos de este análisis se han recopilado en la Tabla 2, empleando el formato de media $\pm$ error estándar.

Determinar el efecto del beta-mercaptoethanol en la maduración nuclear in vitro en ovocitos de porcinos, Tacna – 2024.

Tabla 3 : *Resultados de estadios de maduración de los tratamientos Control vs Beta-mercaptoetanol expresados en % (media $\pm$ error estándar).*

Tratamiento	n	Vesícula germinal	Anafase	Metafase I	Metafase II	Degenerados
Control	145	25,95 $\pm$ 1,09	8,78 $\pm$ 1,27	21,71 $\pm$ 0,54	18,20 $\pm$ 14,15	25,37 $\pm$ 0,88
Beta	133	19,64 $\pm$ 1,10	5,43 $\pm$ 0,72	30,58 $\pm$ 1,72	24,67 $\pm$ 0,79	19,68 $\pm$ 1,05

De acuerdo con los valores de la Tabla 3, se observó una reducción en la proporción de ovocitos que permanecieron en el estadio de vesícula germinal dentro del grupo suplementado con β -mercaptoetanol (19,6 %) respecto al grupo control (26,0 %). Esta disminución sugiere que una mayor proporción de ovocitos expuestos a β -mercaptoetanol abandonó el estado

inmaduro y progresó hacia etapas más avanzadas de la maduración nuclear.

En la fase de anafase, el grupo control presentó un 8,8 % de ovocitos, mientras que el grupo tratado con Beta-mercaptoetanol disminuyó a 5,4 %. Este resultado indica que el compuesto no favorecería la permanencia en estadios tempranos de división nuclear.

Un comportamiento opuesto se observó en metafase I, donde el grupo control alcanzó un 21,7 % de ovocitos, mientras que el tratamiento con Beta-mercaptoetanol incrementó significativamente este porcentaje a 30,6 %. Esto sugiere que dicha adición favorece la progresión hacia etapas intermedias de la maduración nuclear.

De manera similar, en metafase II, etapa considerada como maduración nuclear completa, el grupo control alcanzó un 18,2 % de ovocitos, mientras que el grupo tratado con Beta-mercaptoetanol presentó un aumento a 24,7 %. Este resultado refuerza la hipótesis de que el Beta-mercaptoetanol podría tener un efecto positivo sobre la maduración completa de los ovocitos.

Respecto a la degeneración ovocitaria, se observó un 25,4 % de ovocitos degenerados en el grupo control, en contraste con un 19,7 % en el grupo tratado con Beta-mercaptoetanol, lo cual sugiere un posible efecto protector del compuesto frente a la degeneración celular.

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas según la prueba t de Student ($\alpha = 0,05$), en conjunto, estos resultados indican que el Beta-mercaptoetanol tiende a reducir la

proporción de ovocitos en vesícula germinal, favorecer la progresión hacia metafase I y II, y disminuir la proporción de ovocitos degenerados. Estos efectos podrían atribuirse a la acción antioxidante del Beta-mercaptoetanol, conocida por proteger a las células del daño oxidativo y favorecer su desarrollo. No obstante, se requieren estudios adicionales para confirmar y ampliar estos hallazgos.

Determinar el efecto de la combinación del IGF-1 y beta-mercaptoethanol en la maduración nuclear in vitro en ovocitos de porcinos, Tacna – 2024.

Tabla 4 : *Resultados de estadios de maduración de Control vs B+IGF-1 expresados en % (media $\pm$ error estándar).*

Tratamiento	n	Vesícula germinal	Anafase	Metafase I	Metafase II	Degenerados
Control	145	25,95 $\pm$ 1,09	8,78 $\pm$ 1,27	21,71 $\pm$ 0,54	18,20 $\pm$ 14,15	25,37 $\pm$ 0,88
B+IGF-1	148	13,87 $\pm$ 0,52	8,93 $\pm$ 11,91	34,94 $\pm$ 1,12	13,27 $\pm$ 0,35	28,98 $\pm$ 0,32

En la Tabla 4, se muestra los diferentes estadios de maduración nuclear, comparando el grupo control con el grupo tratado con β -mercaptoetanol + IGF-1.

La mayor proporción de ovocitos en vesícula germinal (VG) correspondió al grupo control, con 25,9 %, mientras que el grupo tratado presentó un valor inferior, de 13,9 %. En la fase de anafase, ambos grupos

mostraron porcentajes similares (8,8 % en el grupo control y 8,9 % en el grupo tratado), sin diferencias significativas.

En la etapa de metafase I, se evidenció una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre tratamientos. El grupo tratado con β -mercaptoetanol + IGF-1 alcanzó la mayor proporción de ovocitos en esta fase (34,9 %), en comparación con el grupo de control (21,7 %).

En el estadio de metafase II, se observó una mayor proporción de ovocitos en el grupo control (18,2 %) respecto al grupo tratado (13,2 %), sin diferencias significativas. Por último, la proporción de ovocitos que presentaron degeneración fue más alta en el grupo tratado (29 %) que en el de control (25,4 %), aunque tampoco se observaron diferencias estadísticas entre estos valores.

4.2. Contrastación de hipótesis

Objetivo general

Evaluar el efecto del IGF-I y beta-mercaptoethanol en la maduración *in vitro* en ovocito de porcino, Tacna - 2024.

- **Hipótesis nula (H_0):** La incorporación de IGF-1 y/o β -mercaptoetanol no tiene un efecto significativo sobre la maduración nuclear in vitro de ovocitos porcinos.
- **Hipótesis alternativa (H_1):** La inclusión de IGF-1 y/o β -mercaptoetanol afecta de manera significativa la maduración nuclear in vitro de ovocitos porcinos.

Objetivos específicos

d) Determinar el efecto del IGF- 1 en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos de porcinos, Tacna - 2024.

- **Hipótesis nula (H_0):** El IGF-1 no influye significativamente en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos porcinos.
- **Hipótesis alterna (H_1):** El IGF-1 influye significativamente en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos porcinos.

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

Resultados: En todas las fases analizadas (vesícula germinal, metafase I, anafase, metafase II y degenerados), los valores de p fueron mayores a 0,05 ($p > 0,05$).

Decisión: No se rechaza H_0 .

Conclusión: El IGF-1 no presentó un efecto estadísticamente significativo en la maduración nuclear *in vitro* de ovocitos porcinos.

e) Determinar el efecto del beta-mercaptoethanol en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos de porcinos, Tacna - 2024.

- **Hipótesis nula (H_0):** El beta-mercaptoetanol no influye significativamente en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos porcinos.
- **Hipótesis alterna (H_1):** El beta-mercaptoetanol influye significativamente en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos porcinos.

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

Resultados: En todas las etapas analizadas (vesícula germinal,

metafase I, anafase, metafase II y ovocitos degenerados), los valores de p fueron superiores a 0,05 ($p > 0,05$), lo que indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Decisión: No se rechaza H_0 .

Conclusión: El β -mercaptoetanol no mostró un efecto estadísticamente significativo en la maduración nuclear *in vitro* de ovocitos porcinos.

f) Determinar el efecto de la combinación del IGF-1 y beta-mercaptoethanol en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos de porcinos, Tacna - 2024.

- **Hipótesis nula (H_0):** La combinación de IGF-1 y β -mercaptoetanol no influye significativamente en la maduración nuclear *in vitro* de ovocitos porcinos.
- **Hipótesis alterna (H_1):** La combinación de IGF-1 y β -mercaptoetanol influye significativamente en la maduración nuclear *in vitro* de ovocitos porcinos.

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

Resultados:

Tras el análisis de los datos, la fase de Metafase I mostró una p de 0,03941, debido a que esta cifra es inferior al alfa de 0,05, indicando una diferencia estadísticamente significativa. En las fases de Vesícula Germinal (VG), Anafase, Metafase II y Degenerados, los valores de p fueron mayores a 0,05, por lo que no se evidenciaron diferencias significativas.

Decisión.

El análisis de la Metafase I arrojó un valor p (0,03941) menor al nivel

alfa de 0,05; por lo tanto, se rechaza H_0 para concluir que la suplementación del medio influyó de manera determinante en la maduración nuclear

Conclusión:

En la fase de Metafase I, la combinación de IGF-1 y β -mercaptoetanol mostró un efecto positivo y estadísticamente significativo sobre la maduración nuclear in vitro ($p = 0,03941 < 0,05$).

Aunque el valor es cercano al umbral de significancia, se recomienda interpretar el resultado dentro de su contexto biológico.

En las fases de Vesícula Germinal, Anafase, Metafase II y Degenerados, los valores p fueron mayores a 0,05, por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

La maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos porcinos es un procedimiento intrincado que está influenciado por diversos elementos, entre ellos los factores de crecimiento y antioxidantes (Gilchrist & Thompson, 2007). En este contexto, el Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo 1 (IGF-1) y el Beta-mercaptoethanol han demostrado ser aditivos relevantes para la mejora de la calidad de los ovocitos durante la MIV, aunque sus efectos varían en función del estadio de maduración y del modelo experimental utilizado (Gupta et al., 2010).

5.1. Efecto del IGF- 1 en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos de porcinos.

De acuerdo con este estudio, incluir IGF-1 en los medios de cultivo para la maduración de ovocitos porcinos afecta la distribución de los estadios nucleares. Se registró una disminución en la proporción de ovocitos en vesícula germinal (VG) en el grupo tratado con IGF-1 (14,1 %) frente al grupo control (25,9 %), lo que indica que IGF-1 facilita el reinicio de la meiosis y la progresión hacia etapas más avanzadas, coincidiendo con lo reportado por Van et al. (2009), quienes señalaron que IGF-1 activa la vía PI3K/Akt-MAPK, promoviendo la maduración nuclear temprana.

De igual modo, el aumento en la proporción de ovocitos en metafase I (MI) en el grupo IGF-1 (33,5 %) frente al grupo control (21,7 %) respalda la evidencia de que este factor de crecimiento estimula la progresión meiótica, lo cual también fue reportado por Guilherme et al. (2013), quienes

demonstraron que el IGF-1 incrementa la maduración nuclear en ovocitos porcinos, especialmente cuando se combina con líquido folicular de folículos pequeños. Esta mejora en la tasa de MI indica un papel modulador del IGF-1 en la activación de los mecanismos moleculares que regulan la transición del ciclo celular (Guilherme et al., 2013).

En cambio, en estadios más avanzados como metafase II (MII), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (18,2 % control vs. 17,3 % IGF-1), lo que concuerda con los hallazgos de Pereira et al. (2019), quienes reportaron que, aunque el IGF-1 mejora la supervivencia post-vitrificación de ovocitos, su efecto sobre la maduración final no siempre es evidente, posiblemente por la interacción con otros factores presentes en el microambiente.

Respecto a los ovocitos degenerados, el grupo tratado con IGF-1 presentó una ligera mayor proporción de degeneración (29,6 %) comparado con el grupo control (25,4 %), lo que sugiere que, aunque el IGF-1 estimula el avance meiótico, también podría generar efectos adversos sobre la viabilidad ovocitaria, dependiendo de la concentración y las condiciones del cultivo de (Pereira et al., 2019). Sato et al. (2018) mencionaron que el IGF-1 puede aumentar la expresión de receptores IGF-1R en las células del cúmulo, lo cual podría traducirse en una hiperestimulación celular, resultando en efectos no deseados si la dosis no es óptima (Sato et al., 2018)

A nivel nacional, Guillén (2018) encontró que el IGF-1 a 10 ng/ml logró una tasa de maduración nuclear del 61,81 % en ovocitos de alpaca, superando al EGF, lo que respalda el potencial positivo de este factor en especies domésticas. Asimismo, estudios evidenciaron que el IGF-1, en

situaciones de baja concentración de oxígeno, se promovió el crecimiento embrionario *in vitro* en alpacas, destacando la relevancia de las condiciones de cultivo (Huanca & Huanca, 2022). En porcinos, Piscoya (2024) reportó que el IGF-1 influye favorablemente en la tasa de gestación, fortaleciendo su aplicación práctica en biotecnologías reproductivas.

Cabe señalar que, aunque se observaron tendencias favorables del IGF-1 en algunos estadios, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$), lo cual puede atribuirse al tamaño de muestra, la concentración utilizada (10 ng/ml), o a la necesidad de condiciones coadyuvantes como co-factores o ambiente hormonal adecuado para potenciar su efecto (Sánchez et al., 2011).

En conjunto, los hallazgos de este estudio refuerzan la hipótesis de que el IGF-1 participa activamente en la maduración ovocitaria temprana, especialmente hasta la etapa de metafase I. No obstante, sus efectos en etapas más avanzadas y en la viabilidad ovocitaria requieren optimización de protocolo, considerando variables como concentración, tiempo de exposición y condiciones del medio de cultivo (Tiwari et al., 2017).

5.2. Efecto del Beta-mercaptoethanol en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos de porcinos.

Los resultados obtenidos indican que la incorporación de beta-mercaptoethanol en los sistemas de cultivo para la MIV optimiza la cinética nuclear, permitiendo que una mayor proporción de ovocitos porcinos alcance etapas superiores de desarrollo, así como reducir la proporción de ovocitos degenerados (Abeydeera et al. 1998). Si bien las diferencias detectadas no alcanzaron significancia estadística, se observa

una tendencia de relevancia biológica en varios de los parámetros evaluados.

En la etapa de vesícula germinal se observó una menor proporción de ovocitos en el grupo tratado con β -ME (19,6 %) en comparación con el grupo control (25,9 %), esto indica que la acción del antioxidante actuaría como un facilitador de la disolución de la membrana nuclear, promoviendo así la reanudación de los procesos meióticos en el gameto (Coticchio et al., 2004). Estas observaciones se alinean con los reportes previos de Abeydeera et al. (1998), cuyos estudios demostraron que el β -ME aumenta los niveles intracelulares de glutatión, promoviendo así un ambiente más adecuado para la maduración nuclear.

En cuanto a la etapa de metafase I, el grupo tratado con β -ME mostró un incremento notable (30,6 %) frente al grupo control (21,7 %), lo cual sugiere una mayor activación del proceso meiótico intermedio. La tendencia observada en el presente estudio se alinea con las investigaciones de Kobayashi et al. (2006). En sus trabajos, estos autores determinaron un incremento en la excelencia cualitativa de los ovocitos, así como en su potencial para sustentar el desarrollo embrionario temprano al utilizar β -ME durante la maduración in vitro en porcinos.

Asimismo, la proporción de ovocitos que lograron llegar a metafase II fue superior en el grupo mayor en el grupo tratado con β -ME (24,7 %) en comparación con el control (18,2 %). Dado que la metafase II representa el estadio de maduración nuclear completa, este hallazgo refuerza la hipótesis de que β -ME puede mejorar la competencia meiótica de los ovocitos. Este efecto también fue observado por Qi et al. (2022), quienes reportaron que

el β -ME mantiene la homeostasis de la autofagia durante la maduración, lo cual resulta beneficioso para la viabilidad y el desarrollo del ovocito.

Respecto a la tasa de degeneración ovocitaria, el tratamiento con β -ME redujo la proporción de ovocitos degenerados (19,7 %) en comparación con el grupo control (25,4 %), lo que indica un posible efecto protector del compuesto frente al estrés oxidativo. Este hallazgo es respaldado por estudios donde destacaron el papel del β -ME en la mejora de la calidad citoplasmática y en la reducción del daño celular durante la fecundación in vitro (Funahashi & Sano, 2005).

No obstante, los efectos favorables del β -mercaptoetanol no han sido reportados de manera consistente en todos los estudios. Merlo et al. (2016), al analizar su incorporación durante la maduración in vitro de ovocitos equinos, indicaron que tanto el grupo control como los tratamientos enriquecidos con β -ME mostraron un comportamiento estadísticamente similar, concluyendo que este compuesto no influyó en la maduración citoplasmática. Esta variabilidad en los resultados podría atribuirse a diferencias interespecíficas, ya que los ovocitos de equinos presentan particularidades fisiológicas y cinéticas distintas a las de los porcinos. En consecuencia, los efectos positivos del β -ME podrían depender de la especie, la etapa del desarrollo ovocitario o incluso del medio de cultivo empleado.

En conjunto, estos resultados apoyan la utilización de β -mercaptoetanol como suplemento del medio de maduración ovocitaria, aunque se recomienda realizar estudios adicionales con mayor tamaño muestral y análisis moleculares para confirmar estos efectos y dilucidar los mecanismos celulares involucrados.

5.3. Efecto de la combinación del IGF-1 y Beta-mercaptoethanol en la maduración nuclear *in vitro* en ovocitos de porcinos

Los hallazgos sugieren que la suplementación conjunta de IGF-1 y β -mercaptoetanol en el sistema de cultivo ejerce un efecto en el estadio de desarrollo nuclear de los ovocitos porcinos, evidenciándose un mayor porcentaje de ovocitos en metafase I (34,9 %) respecto al grupo control (21,7 %), con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Este resultado sugiere que la combinación de ambos compuestos podría favorecer la progresión temprana de la meiosis durante la maduración ovocitaria.

Estos hallazgos concuerdan con lo descrito por Sato et al. (2018) en ovocitos caninos, quienes evidenciaron que la suplementación con IGF-1 incrementó de manera significativa la proporción de ovocitos en metafase II, acompañada de una mayor expresión del receptor IGF-1R en las células del cúmulo. De manera análoga, Guilherme et al. (2013) informaron que la adición de IGF-1 a medios suplementados con fluido folicular promovió la maduración nuclear y mejoró los resultados de la fertilización *in vitro* en ovocitos porcinos, respaldando así el rol del IGF-1 como un modulador positivo del proceso de maduración.

Asimismo, diversos autores han documentado que el IGF-1 puede actuar de forma sinérgica con otros factores, como lo demostraron Rodríguez et al. (2021) en bovinos, donde la combinación con FSH y EGF promovió una mayor progresión meiótica y expansión del cúmulo. Además, Nogueira et al. (2019) y Wu et al. (2020) demostraron que el IGF-1 favorece la expresión de genes antiapoptóticos y activa rutas como PI3K/AKT y

ERK1/2, mejorando así la calidad citoplasmática y nuclear, lo que puede explicar el avance hacia metafase I observado en el marco de este trabajo.

En cuanto al β -mercaptoetanol, se ha descrito que su función antioxidante mejora la maduración citoplasmática y el ambiente intracelular del ovocito. Aunque Merlo et al. (2016) no encontraron efecto significativo en ovocitos equinos, en porcinos Abeydeera et al. (1998) reportaron un aumento del glutatión intracelular y una mejora en la fertilización y desarrollo embrionario tras su inclusión. Más recientemente, Qi et al. (2022) y Tao et al. (2004) destacaron su papel en la homeostasis de la autofagia y la modulación del óxido nítrico, procesos cruciales en la maduración ovocitaria. Por tanto, su combinación con IGF-1 podría potenciar los efectos beneficiosos observados en la progresión a metafase I.

Aun cuando se observaron efectos favorables en la metafase I, no se evidenciaron diferencias significativas en la metafase II ni en otros estadios nucleares, lo que podría atribuirse a la necesidad de un mayor periodo de cultivo o a que las concentraciones empleadas no fueron las más adecuadas para completar la maduración meiótica. Este resultado es coherente con lo informado por Pereira et al. (2019), quienes, aunque no detectaron cambios significativos en la maduración, sí observaron una mayor supervivencia de ovocitos vitrificados tratados con IGF-1, lo que sugiere que bajo determinadas condiciones su efecto podría ser más protector que estimulador.

Finalmente, a nivel nacional, Guillén (2018) ha demostrado que el IGF-1 mejora la maduración in vitro y el desarrollo embrionario en ovocitos de alpaca, particularmente bajo condiciones controladas de oxígeno. Estos estudios refuerzan la utilidad de IGF-1 en programas de biotecnología

reproductiva en especies domésticas, aunque sus efectos específicos dependen de la especie, concentración y condiciones del cultivo (Huanca & Huanca, 2022).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la combinación de β -mercaptoetanol e IGF-1 puede favorecer la progresión meiótica temprana, específicamente hasta metafase I, en ovocitos porcinos. No obstante, se requieren más estudios para optimizar las concentraciones y tiempos de exposición, así como para evaluar el impacto de esta combinación sobre la maduración completa (metafase II) y el desarrollo embrionario posterior.

5.4. Efecto de los diferentes tratamientos: Beta-mercaptoetanol, IGF-1 y Beta-mercaptoetanol + IGF-1 en la maduración nuclear in vitro

Los datos presentados en la figura 4 indican que los tratamientos con β -mercaptoetanol (β -ME), IGF-1 y su combinación (B+IGF-1) favorecieron la progresión meiótica de los ovocitos porcinos durante la maduración in vitro, reflejándose principalmente en un aumento del porcentaje de ovocitos en metafase I. El tratamiento combinado (B+IGF-1) registró el valor más elevado (34,9 %), seguido de IGF-1 (33,5 %) y β -ME (30,6 %), en contraste con el grupo control (21,7 %). Dichos hallazgos guardan estrecha relación con las observaciones de Guilherme et al. (2013), quienes evidenciaron en su investigación que la adición de IGF-1 al medio de cultivo suplementado con fluido folicular porcino mejora de manera significativa la maduración nuclear y la fertilización in vitro, especialmente a concentraciones intermedias (122–179 ng/mL), similares a las empleadas a partir de nuestra evidencia.

En contraste con lo reportado por Pereira et al. (2019), quienes no observaron un efecto significativo del IGF-1 sobre la maduración nuclear, los resultados del presente estudio muestran una respuesta positiva, lo cual podría atribuirse a diferencias entre especies, a las condiciones de cultivo empleadas o a que no se aplicó vitrificación, evitando así posibles interferencias en la evaluación de la competencia meiótica. Del mismo modo, los hallazgos de Sato et al. (2018) en ovocitos caninos respaldan estos resultados, al demostrar que el IGF-1 incrementa la proporción de ovocitos en metafase II, sugiriendo que su acción se extiende a distintas especies mediante la regulación de receptores específicos como IGF-1R.

No obstante, en el presente estudio no se evidenció un incremento significativo en la proporción de ovocitos en metafase II tras la aplicación de los tratamientos. El grupo control mostró un porcentaje ligeramente superior (18,2 %) en comparación con los grupos tratados con IGF-1 (17,3 %), β -ME (19,7 %) y la combinación B+IGF-1 (13,3 %). Estos resultados difieren de los informados por Rodríguez et al. (2021) en bovinos, quienes registraron un aumento en la tasa de MII cuando el IGF-1 fue utilizado junto con FSH y EGF, lo que sugiere que el IGF-1 de manera aislada podría no ser suficiente para completar la maduración hasta MII y requerir la acción conjunta de otros factores. Esta interpretación también es respaldada por Cao et al. (2022), quienes señalan que el IGF-1 posee un rango de acción estrecho y que concentraciones inadecuadas o la ausencia de cofactores pueden reducir su efectividad o incluso favorecer la aparición de estrés oxidativo.

Respecto al β -mercaptoetanol, nuestros resultados muestran un porcentaje relevante de ovocitos en metafase I (30,6 %) y una reducción en

la proporción de vesícula germinal (19,6 %) comparado con el grupo control (25,9 %). Aunque Merlo et al. (2016) no encontraron efectos significativos del β -ME en equinos, estudios en porcinos como los de Abeydeera et al. (1998) respaldan nuestro hallazgo, mostrando que el β -ME favorece la maduración y mejora la calidad citoplasmática mediante el aumento del contenido intracelular de glutatión y la regulación de procesos clave como la autofagia (Qi et al., 2022) y la acción del óxido nítrico (Tao et al., 2004).

No obstante, es importante mencionar que el tratamiento combinado B+IGF-1 presentó también mayor proporción de ovocitos degenerados (29 %), lo que podría atribuirse a un efecto aditivo no beneficioso o a estrés oxidativo derivado de una sobreestimulación celular. Este efecto adverso ha sido advertido por Cao et al. (2022), quienes indican que concentraciones elevadas de IGF-1 pueden inducir desequilibrios redox y afectar la viabilidad ovocitaria.

A nivel nacional, nuestros resultados también se alinean con los estudios de Guillén (2018) en ovocitos de alpaca, donde el IGF-1 demostró tener un efecto superior frente al EGF sobre la maduración y el desarrollo embrionario. Aunque las especies son diferentes, estos hallazgos refuerzan la acción conservada del IGF-1 en distintos modelos reproductivos. Además, el trabajo de Piscoya (2024) en cerdas sugiere que el IGF-1 está vinculado a la eficiencia reproductiva general, indicando que su papel es relevante tanto en la fase pre-fertilización como en etapas posteriores de gestación.

En conjunto, los hallazgos de este estudio revelan que la adición de IGF-1 y β -mercaptoetanol, especialmente cuando se aplican por separado, mejora la progresión meiótica hasta la metafase I, aunque no se logra un

incremento significativo en la proporción de ovocitos que alcanzan la metafase II. Esto sugiere que podrían requerirse combinaciones más específicas con otros factores embriotróficos o ajustes en las condiciones del cultivo in vitro para alcanzar una maduración nuclear completa y efectiva.

CONCLUSIONES

1. IGF-1 redujo los ovocitos en vesícula germinal y aumentó Metafase I, pero no mejoró Metafase II y elevó la degeneración. Por tanto, no resultó eficaz para completar la maduración nuclear bajo las condiciones evaluadas.
2. Beta-mercaptoethanol disminuyó los ovocitos inmaduros y aumentó Metafase I y II, reduciendo además la degeneración. Se considera un suplemento favorable para mejorar la maduración nuclear in vitro.
3. La combinación Beta-mercaptoethanol + IGF-1 incrementó Metafase I y redujo inmaduros, pero no mejoró Metafase II ni la degeneración, por lo que no mostró un efecto superior al Beta-mercaptoethanol solo.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar de manera sistemática el impacto del tiempo de exposición al IGF-1 y al β -mercaptoetanol sobre la maduración nuclear y citoplasmática de ovocitos porcinos, para maximizar la eficacia del sistema de maduración in vitro y elevar los estándares de calidad meiótica y citoplasmática en los ovocitos evaluados.
2. Investigar el efecto sinérgico de la combinación de IGF-1 y β -mercaptoetanol sobre la maduración nuclear y citoplasmática, así como sobre la calidad mitocondrial de ovocitos porcinos, para maximizar la eficiencia del sistema de maduración en laboratorio y asegurar que los óvulos alcancen una madurez integral y funcional.
3. Efecto de hormonas (IGF-1, FSH y EGF) en la progresión meiótica de ovocitos porcinos mediante tinción de cromatina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeydeera, R., Wang, H., Cantley, C., Prather, S., & Day, N. (1998). Presence of β mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology*; 50 (1): 747-756. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00180-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00180-0)
- Abeydeera, R., Wang, H., Cantley, C., Rieke, A., Murphy, N. & Prather, S. (2000). Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*; 54:787–97. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00390-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00390-3)
- Abramovich, D., Irusta, G. & Parborell, M. (2014). *Foliculogénesis. Ascune*. Ascune. <http://hdl.handle.net/11336/131442>
- Alvarado, A. & Mayani, H. (2007). *El ciclo celular y su papel en la biología de las células progenitoras hematopoyéticas*. Gac Med Mex. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4362713>
- Aponte, J.L., Villamediana, P., Fonseca, H.H., & Belloso, E.S. (2010). Efecto del tiempo de maduración in vitro de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. *Revista Científica*, 20(6), 659–664.
- Arainga, R., (2011). *Guía de Investigación Científica*. Fondo Editorial. UCH. <https://repositorio.uch.edu.pe/handle/20.500.12872/23>

- Baker, T. G., & Anderson, E. (2005). The use of tissue culture media in mammalian cell culture. *Journal of Cell Biology*, 25(3), 345-352.
- Betancourt, M., Casas, E., Bonilla, E. & Ducolomb, R. (2003). *Maduración de gametos y fertilización en mamíferos*. Ed. Prentice Hall.
- Block, J. & Hansen, P. (2007). Interaction between season and culture with insulin like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology*, 67 (9): 1518-1529. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.012>
- Buccione, R., Schroeder, C. & Eppig, J. (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*; 43 (4): 543- 7. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.4.543>.
- Bustamante, B. (2008). *Estudio molecular y de apoptosis en ovocitos de cabras prepúberes y su relación con el desarrollo embrionario* [Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona]. <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2007/tdx-0629107-124845/bab1de1.pdf>
- Byskov, G. & Nielsen, M. (2003). Ontogeny of the mammalian ovary. *Biology and Pathology of the Oocyte*, 13-28. <https://www.cambridge.org/core/books/biology-and-pathology-of-the-oocyte/ontogeny-of-the-mammalian-ovary/5504A38C9C615FD23A8E3B177A16BC5C>

Camal Municipal de Tacna. (2023). *Registro estadístico de beneficio de ganado porcino, noviembre 2023*. Tacna, Perú.

Cao, Y., Li, R., Zhao, Z., & Wang, Z. (2022). Effects of IGF-1 supplementation on in vitro maturation and developmental competence of mammalian oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00911-3>

Carvajal C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*; 36 (1). https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091

Choe, C., Shin, Y., Kim, E., Cho, S., Kim, H., Choi, S., & Eum, S. (2010). Synergistic effects of glutathione and β -mercaptoethanol treatment during in vitro maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine. *Journal of Reproduction and Development*, 56, 575–582. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-214h>

Chong, F., Bahena, I., Casas, E., Betancourt, M., Ducolomb, Y., González, C., Cuapio, P., & Bonilla, E. (2018). *La ATPasa6 participa en la maduración de ovocitos de cerdo in vitro*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2): 85-90, <https://www.medigraphic.com/pdfs/revespciequibio/cqb-2018/cqb182a.pdf>

- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., Mermillod, P., & Cognie, Y. (2004). *Current status of embryo technologies in sheep and goat*. *Theriogenology*, 59(1), 171–188. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2002.10.012>
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Lawrence Erlbaum Associates.
- Colazo, G., & Mapletoft, R. (2017). Fisiología del ciclo estral bovino. *Ciencia Veterinaria*, 16(2), 31-46. https://www.researchgate.net/publication/262106069_Fisiología_del_ciclo_estral_bovino
- Combelles, M., Gupta, S., & Agarwal, A. (2009). Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes?. *Reproductive biomedicine online*, 18(6), 864–880. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60038-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60038-7)
- Contreras, M. (2014). *Evaluación de la calidad de embriones producidos por fertilización in vitro en alpacas (Vicugna pacos)* [Tesis de grado, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. <https://hdl.handle.net/20.500.12955/2328>
- Coticchio, G., Sereni, E., Serrao, L., Mazzone, S., Iadarola, I., & Borini, A. (2004). What criteria for the definition of oocyte quality?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1034, 132–144. <https://doi.org/10.1196/annals.1335.016>

Cran, D. G., & Cheng, W. T. K. (1986). The cortical reaction in pig oocytes during in vivo and in vitro fertilization. *Gamete Research*. (citado en Kim, 1996)

Cuello, C., Roca, J., Vázquez, M., & Martínez, E. (2005). *Vitrificación y transferencia no quirúrgica de embriones porcinos* [Tesis de grado, Universidad de Murcia]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1174105>

Do, T., Luu, V., Morita, Y., Taniguchi, M., Nii, M., Peter, T., & Otoi, T. (2015). Astaxanthin present in the maturation medium reduces negative effects of heat shock on the developmental competence of porcine oocytes. *Reproductive biology*, 15 (2), 86-93 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1642431X15000120>

Du, S., Makker, K., Desa, N. & Agarwal, A. (2008). Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Rev ObstetGynecol*: 3(4), 539-554. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/17474108.3.4.539>

Espey, L. L. (1974). Ovarian proteolytic enzymes and ovulation. *Biology of Reproduction*, 10(2), 216–235. <https://doi.org/10.1095/biolreprod10.2.216>

Esquirol, J. & Herrero, E. (2017). Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y geles de silicona en el abordaje de heridas, quemaduras y cicatrices: revisión de la literatura. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, 43(4), 387-394.

<https://scielo.isciii.es/pdf/cpil/v43n4/0376-7892-cpil-43-04-387.pdf>

Fernández, F., Hernández, E., & Pichardo, I. (2007). Maduración in vitro de ovocitos de ovino usando concentraciones de FSH+LH y FSH en medio de cultivo. *Revista de Salud Animal*, 29(2), 105-110. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0253-570X2007000200007.

Fernández, F., Hernández, P., & Reyes, M. (2010). Maduración y fertilización in vitro de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. *Revista de Salud Animal*, 32(2), 78-83. <http://scielo.sld.cu/pdf/san/v32n2/san08210.pdf>

Feugang, M., Roover, R., Moens, A., Léonard, S., Dessy, F., & Donnay, I. (2004). Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology*, 61(1), 71–90. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00191-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00191-2)

Filipiak, Y., Viqueira, M. & Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(202), http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttextpid=S1688-48092016000200002.

Funahashi, H, Cantley, C. & Day, N. (1997). Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine

monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biology of reproduction*, 57(1), 49–53. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/57/1/49/2760775>

Funahashi, H., & Day, B. N. (1997). Advances in in vitro production of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 52, 271-283. <https://europepmc.org/abstract/MED/9602735>

Funahashi, H., & Sano, T. (2005). Effect of β -mercaptoethanol during in vitro fertilization procedures on sperm penetration into porcine oocytes and the early development in vitro. *Reproduction*, 130(6), 889–898. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00794> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1530794/>

Garrido, N., & Fernández, S. (2010). The role of serum and hormones in the in vitro maturation of oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, 45-53. <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-8-45>

Gilchrist, R. B., & Thompson, J. G. (2007). *Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro*. *Theriogenology*, 67(1), 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.027>

Gilula, B., Epstein, L., & Beers, H. (1978). Cell-to-cell communication and ovulation: a study of the cúmulo-oocyte complex. *J Cell Biol*; 78: 58-75.

<https://rupress.org/jcb/article/78/1/58/29720/Cell-to-cell-communication-and-ovulation-A-study>

Ginther, J., Wiltbank, C., Fricke, M., Gibbons, R., & Kot, K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*; 55:1187-94.<https://academic.oup.com/biolreprod/article/55/6/1187/2760595>

Ginther, O., Beg, M., Bergfelt, D., Donadeu, F., & Kot, K. (2001). Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.* 65, 638-647.
<https://academic.oup.com/biolreprod/article/65/3/638/2723169>

Gonzáles, H., & Gonzáles, H. (2005). Biotecnología reproductiva: una alternativa para mejorar la producción animal. *Biotempo*; 5: 5-11.
<https://www.urp.edu.pe/pdf/id/2218/n/pdf>

González, R., Olivas, R., & Rodríguez, G. (2014). Aplicación de la vitrificación de ovocitos en la mejora genética porcina. *Ciencias Veterinarias*, 56(2), 122-130.<https://revistas.unam.mx/index.php/cv/article/view/46550>

Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos* (2nd ed.). CABI Publishing.

Goud, P., Goud, T., Diamond, P., Gonik, B., & Abu, M. (2008). Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free radical biology y medicine*, 44(7), 1295–1304.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584908000385>

Griffin, E., & Ojeda, S. (2000). Textbook of Endocrine Physiology. *Fourth Edition*; 18-19.
<https://global.oup.com/academic/product/textbook-of-endocrine-physiology-9780195135412>

Guilherme, B., Tannus, R., Martins, T., & Ambrosio, C. (2013). Effect of IGF-I and follicular fluid on the in vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Animal Reproduction Science*, 140(1-2), 52–58.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.06.007>

Guillén, J. (2017). Efecto de factores de crecimiento sobre la tasa de maduración de ovocitos de alpaca. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
<https://repositorio.unsch.edu.pe/server/api/core/bitstreams/c71152d6-33d1-458e-8257-4a822b9824d1/content>

Guillén, M. (2018). Efecto del IGF-1 y EGF en la maduración in vitro de ovocitos de alpaca (*Vicugna pacos*) [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina].
<https://repositorio.unsch.edu.pe/server/api/core/bitstreams/c71152d6-33d1-458e-8257-4a822b9824d1/content>

Gupta, K., Uhm, J., & Lee, 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://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028210001032>

- Hafez, E. S. E. & Hafez, B. (2002). Fecundación y segmentación. En E. S. E. Hafez y B. Hafez (Eds.), *Reproducción e inseminación artificial en animales* (7ª ed., pp. 110-125). McGraw-Hill Interamericana.
- Hall, E., & Guyton, C. (2016). *Guyton y Hall: Compendio de fisiología médica*. Barcelona: Elsevier.
- Harvey, B., Leco, J., Arcellana, Y., Zhang, X., Edwards, R. & Schultz, A. (1995). Roles of growth factors during peri-implantation. *Mol Hum Reprod*; 10: 712-718.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7782459/>
- Hashem, A., Hossein, S., Woo, Y., Kim, S., Kim, H., Lee, H., Koo, J., Park, M., Lee, G., Kang, K., & Lee, C. (2006). Effect of potassium simplex optimization medium and NCSU23 supplemented with beta-mercaptoethanol and amino acids of in vitro fertilized porcine embryos. *The Journal of reproduction and development*, 52(5), 591–599.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/52/5/52_5_591/_article
- Herrera, V. & Jara, O. (2009). *Comparación de dos suplementos para maduración de ovocitos ovinos in vitro* [Tesis, de grado, Universidad de la Salle].
<https://studylib.es/doc/7406612/comparaci%C3%B3n-de-dos-suplementos-para-maduraci%C3%B3n-de-ovocitos>

- Huanca M., T., & Huanca, W. (2022). Efecto de factores embriotróficos a diferentes tensiones de oxígeno en cultivo in vitro sobre el desarrollo embrionario de alpacas hasta la etapa de blastocisto. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 36(2), 113-121. https://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?pid=S1390-85962022000200113&script=sci_arttext
- INEI, (2024). *Instituto Nacional de Estadística e Informática*. Visitado el 07 de Junio. <https://www.inei.gob.pe/estadisticas/encuestas/>
- Keskintepe, L., Burnley, A. & Brackett, G. (1995). Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biol Reprod.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7632849/>
- Kobayashi, M., Lee, S., & Fukui, Y. (2006). Cisteamina or beta-mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 65(6), 1191–1199. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X05003304>
- Kocyigit, A. & Cevik, M. (2015). Effects of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor-I on the cell allocation and cryotolerance of bovine blastocysts. *Cryobiology* 71, 64–69. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.05.068. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224015001741>

Leininger, M., Edwards, L., Lipshaw, J., & Feldman, L. (2006). Mechanisms of disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol*; 2:620-8. <https://www.nature.com/articles/ncpneuro0320>

Lenz, M., Ramírez, G., & Fernando, L. (2007). Papel del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) en la regulación de la función ovárica / Role of the insulin-like growth factor (IGF-1) in the ovaric function regulation. *Biosalud*. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-492632>

Lenz, M.I., Ramírez, G.F., & Uribe, L.F. (2007). Papel del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) en la regulación de la función ovárica. *Biosalud*, v.6, p.149-159, https://www.researchgate.net/publication/275520581_Papel_del_factor_de_crecimiento_semejante_a_la_insulina_IGF-1_en_la_regulación_de_la_función_ovárica

Lino, M., Alfredo, A., Chasi O., & Byron, E. (2021). *Efecto de dos medios de maduración sobre la producción de embriones partenogenéticos en bovinos*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria Ingeniería Agronómica, <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/7048>

Lonergan, P., & Fair, T. (2008). *Oocyte and embryo quality: Effect of origin and culture conditions*. *Theriogenology*, 69(1), 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.019>

Lorenzo, M., Maruri, A., Cruzans, P., Teplitz, G., Tello, M., & Lombardo, D. (2019). The antioxidant dimethylthiourea improves IVF efficiency and decreases cumulus cell apoptosis in pigs. *Reproduction Fertility and Development*.
<https://www.publish.csiro.au/rd/RD19020>

Machado, G.M., Carvalho, J.O., Siqueira-Filho E., Caixeta, E.S., Franco, M.M. Rumpf R., Dode M.A., Jeong, B. S., & Yang, X., (2001). Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*. 71 (1289-1297).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X09000211>

Marinone, A. I., Kaiser, G., Hozbor, F., & Mucci, N. (2018). Biotécnicas reproductivas en la especie porcina: pasado, presente y futuro. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*.
<http://hdl.handle.net/20.500.12123/3352>

Martino, A., Palomo, J.M., & Mogas, T. (1994). Influence of the collection technique of prepuberal goats on in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*; 42: 859-873.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9490454Q>

Matos, D. G., & Furnus, C. C. (2000). The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of β -mercaptoethanol, cysteine and

cystine. *Theriogenology*, 53(3), 761–771. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00278-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00278-2)

May, J. V., Frost, J. P., & Shomberg, D. W. (1988). Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor-beta on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. *Endocrinology*, 123(1), 168–179. <https://academic.oup.com/endo/article/123/1/168/3025982>

McNutt, T. & Killian, G. (1991). Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J. Androl.* 12: 244-252. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019656489180019X>

Merlo, B., Iacono, E., Bucci, D., Spinaci, M., Galeati, G., & Mari, G. (2016). Beta-mercaptoethanol supplementation of in vitro maturation medium does not influence nuclear and cytoplasmic maturation of equine oocytes. *Reproduction in domestic animals. Zuchthygiene*, 51(6), 992–996. <https://doi.org/10.1111/rda.12778>

Mermillod, P., Oussaid, B., & Cognie, Y. (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl*; 54:449-60. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10692875/>

MIDAGRI (2024). *Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego*. Visitado el 07 de Junio. <https://www.gob.pe/midagri>

- Moor, R.M., Mattioli, M., Ding, J., & Nagai, T. (1990). Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Reproduction Supplement*; 58, 91-104 <https://www.bioscioproceedings.org/bp/0016/bp0016cpr7.pdf>
- Mostefai, H., Agouni, A., Carusio, N., Mastronardi, M., Heymes, C., Henrion, D., Andriantsitohaina, R., & Martínez, C. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase and xanthine oxidase regulate nitric oxide and reactive oxygen species production by apoptotic lymphocyte microparticles in endothelial cells. *The Journal of Immunology*, 180(7), 5028–5035. <https://www.jimmunol.org/content/180/7/5028>
- Motlik, J., Crozet, N., & Fulka, J. (1984). Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of reproduction and fertility*; 323–328. https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/72/2/jrf_72_2_008.xml
- Nagashima, H., Grupen, C.G., Ashman, R.J., & Nottle, M.B. (1996). Developmental competence of in vivo and in vitro matured porcine oocytes after subzonal sperm injection. *Mol Reprod Dev.*; 45: 359-363. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199611\)45:3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199611)45:3)
- Nogueira, M. F., de Matos, D. G., & Fontes, R. S. (2019). IGF-I supplementation during in vitro maturation improves the competence and quality of goat oocytes. *Theriogenology*, 140, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.003>

- Nohalez A. (2018). *Advances in in Vitro and in Vivo Porcine Embryo Production* [Tesis de grado, Universidad de Murcia]. <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/59721>
- Oshida, M. (1993). Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 35: 76-81. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.1080350110>
- Palma, G. A. (2007). Biología y biotecnología del desarrollo folicular temprano. En *Biotecnología de la reproducción* (pp. 73–92).
- Pankaj A. P., Sandhya S. C., Gopal P., Virendra K. S. & Arjun B. (2015). Effects of β -mercaptoethanol on in vitro maturation and glutathione level of buffalo oocyte. *Veterinary World* 8(2):213-216. <https://www.veterinaryworld.org/Vol.8/Feb-2015/7.pdf>
- 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, 1894. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01894>
- Pereira, D. C., Oliveira, C. R., & Teixeira, P. P. M. (2019). Influence of IGF-1 and reduced glutathione on pig oocyte vitrification and gene expression. *Zygote*, 27(2), 137–144. <https://doi.org/10.1017/S0967199418000741>

Petters, R.M., & Wells, K.D. (1993). Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil* 48 (Suppl): 61-73.
<https://www.bioscioproceedings.org/bp/0014/pdf/bp0014cpr5.pdf>

Pinheiro, M. L. (1973). *Los cerdos. Reproducción*. Editorial hemisferio Sur.
https://books.google.com/books/about/Los_cerdos.html?id=bi6JHAAACAAJ

Piscoya, C. A. (2024). Factor de crecimiento insulínico (IGF) y su relación en la gestación de marranas. *Ciencia y Sociedad*, 4(7), 1-10.
<https://revistas2.unprg.edu.pe/ojs/index.php/CURSO/article/view/592>

Pourova, J., Kottova, M., Voprsalova, M., & Pour, M. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta physiologica* (Oxford, England), 198(1), 15–35.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.02039.x>

Pyoos, S. E., Ferreira, G., & Nedambale, T. L. (2018). The comparison of three media on the in vitro maturation rate of pig oocytes. *South African Journal of Animal Science*, 48(7), 1025-1032.
https://www.researchgate.net/publication/329423018_The_comparison_of_three_media_on_the_in_vitro_maturation_rate_of_pig_oocytes

Qi, J. J., Li, X. X., Zhang, Y., Diao, Y. F., Hu, W. Y., Wang, D. L., Jiang, H., Zhang, J. B., Sun, B. X., & Liang, S. (2022). 2-mercaptoethanol promotes porcine oocyte maturation in vitro by

maintaining autophagy homeostasis. *Theriogenology*, 177, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.013>

Richard, R. J., (2007). Regulation of meiotic maturation. *Journal of Animal Science*, 85, Pages E4–E6.
https://academic.oup.com/jas/articleabstract/85/suppl_13/E4/4775301

Rikans, L. E., & Hornbrook, K. R. (1997). Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica et biophysica acta*, 1362(2-3), 116–127.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443997000677>

Robledo, J. M., Herrera, J., Cajero, M., Navarro, M. C., & García, A. (2009). Evaluación de dos medios de maduración in vitro para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1).
<https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/49/20>

Rodríguez, A. L., Gómez, E., & Hidalgo, C. O. (2021). Combined effect of IGF-1, FSH and EGF on in vitro maturation and embryo development in bovine. *Animal Reproduction Science*, 228, 106747. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106747>

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

- Romaguera, R., Casanovas, A., Morató, R., Izquierdo, D., Catalá, M., & Jiménez-Macedo, A. R. (2010). *Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepuberal goats*. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.019>
- Romero, F. J., Miguel-Lasobras, E. M., Domínguez-Arroyo, J. A., González-Carrera, E., & Alvarez, I. S. (2008). Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reproductive biomedicine online*, 17(5), 652–661. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60312-4](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60312-4)
- Salgado, R., Simanca, J., & Vergara, O. (2013). Efecto del factor de crecimiento epidermal (egf) sobre la maduración de ovocitos bovinos cultivados in vitro. *Revista Científica De La Facultad De Ciencias Veterinarias De La Universidad Del Zulia*, 23(4). <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/15811>
- Sánchez, A., Martínez, A., & Gómez, C. (2011). El papel del betamercaptoetanol en la maduración in vitro de ovocitos porcinos. *Animal Reproduction Science*, 125(3-4), 147-154.
- Sato, D., Otoi, T., & Miyano, T. (2018). Expression of IGF receptors and effect of IGF-1 on oocyte maturation in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(10), 1585–1591. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0223>

- Senger, P. L. (1999). Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Conceptions, Inc.
- Sienes, P., Fabre M., Cuenca J., & César M. (2022). Más allá del cambio metodológico en la práctica clínica: Evaluación de las pruebas de factor de crecimiento insulínico tipo 1. *Adv Lab Med*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10197398/>
- Sousa, V. D., Driessnack, M., & Mendes, I. A. (2007). Revisión de los diseños de investigación relevantes para la enfermería: Parte 1: Diseños de investigación cuantitativa. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 15(4), 702-707.
- Tao, Y., Xia, G., Bo, S., Zhou, B., Zhang, M., & Wang, F. (2004). Nitric oxide exerts different functions on porcine oocytes cultured in different models, which is affected by β -mercaptoethanol. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17(3), 317–324. <https://doi.org/10.5713/ajas.2004.317>
- Tarazona, A. (2010). La competencia del oocito: qué, cómo y cuándo. *Acta biol. Colomb*; 15 (3): 3 – 18. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/47603>
- Thibault C., Szòllósi D. & Gerard M. (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Develop* 27: 865-896
- Tiwari, M., Dey, S., & Ghosh, S. (2017). Estudio de la influencia del IGF-1 en la maduración in vitro de ovocitos de cerdo. *Animal Reproduction*, 13(1), 12-18.

- Van den Hurk R. & Zhao J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*; 63: 1717-1751.
- Van, G. C., Taverne, M. A. & Koster, J. E. (2009). Maduración in vitro de ovocitos porcinos y sus implicaciones en la biotecnología reproductiva. *Journal of Reproduction and Fertility*; 136(2): 233-241.
- Vásquez, N.A., Torres, V., & Rojano, B.A. (2014). Efecto del ácido ascórbico durante maduración in vitro de oocitos bovinos en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y competencia para el desarrollo embrionario. *Información tecnológica*, 25(2), 141-150: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642014000200016>
- Wang, Z. G., Yu, S. D., & Xu, Z. R. (2007). Effect of supplementation of green tea polyphenols on the developmental competence of bovine oocytes in vitro. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(8), 1079–1085. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2007000800008>
- Wen, J., Wang, G.-L., Yang, H.-Y., Zhang, J., Liu, H., Sun, S., & Tian, J.-H. (2020). O-GlcNAcylation orchestrates porcine oocyte maturation through maintaining mitochondrial dynamics and function. *Molecular Human Reproduction*, 26(3), 1–15.
- Wu, J., Wang, Y., & Lin, X. (2020). IGF-1 promotes oocyte maturation via PI3K/AKT and MAPK pathways in mouse. *Reproductive*

Sciences, 27(6), 1341–1349. <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00142-1>

Xia, P., Francis, R., Tekpetey, F. R., & Armstrong, D. T. (1994). Effect of insulin-like growth factor I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development in vitro, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. *Molecular Reproduction and Development*, 38(4), 373–379. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080380404>

Yamauchi, N., Kikuchi, K., Izaïke, Y., & Kanagawa, H. (1996). In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Animal Reproduction Science*, 43(2–3), 123–130. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01487-X](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01487-X)

Ye, J.; Campbell, K., Craigon, J., & Luck, M. (2005). Dynamic changes in meiotic progression and improvement of developmental competence of pig oocytes in vitro by follicle-stimulating hormone and cycloheximide. *Biology of Reproduction*; 72: 399-406. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/72/2/399/2667135?login=false>

Yoshida, M., Ishizaki, K., & Kawagishi, H. (1990). *Blastocyst formation by pig embryos resulting from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88(1), 1–8. https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/88/1/jrf_88_1_001.xml

- Yoshioka, K., Suzuki, C., Tanaka, A., & Anas, I. M., Iwamura, S. (2002). Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biology of reproduction*; 66(1), 112–119.
- Zhang, M., Wang, F. S., & Tan, J. H. (2008). "The role of growth factors in the in vitro maturation of oocytes in goats." *Animal Reproduction Science*, 104(1-2), 127-135.
- Zhao, X. M., Wang, N., Hao, H. S., Li, C. Y., Zhao, Y. H., Yan, C. L., & Hua-Bin, L. (2018). Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. *Journal of Pineal Research*, 64(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12424>
- Zheng, Y. S., & Sirard, M. A. (1992). *The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes*. *Theriogenology*, 37, 779–790. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90041-O](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90041-O)

ANEXOS

Anexo 1. Datos empleados para el análisis estadístico

Tabla 5 : *Número de ovocitos en estadios vesícula germinal, metafase I, anafase, metafase II y degenerados (sin adición).*

TRATAMIENTO	VG	MI	A	MII	D	TOTAL
	4	3	2	3	5	17
	1	2	5	2	2	12
	10	10	0	3	8	31
CONTROL	3	5	2	8	7	25
	7	5	0	12	5	29
	9	6	0	2	3	20
	4	2	0		5	11
TOTAL	38	33	9	30	35	145

Tabla 6 : *Número de ovocitos en estadios vesícula germinal, metafase I, anafase, metafase II y degenerados (con adición de IGF-1).*

TRATAMIENTO	VG	MI	A	MII	D	TOTAL
	0	2		2	2	6
	1		1	2	5	9
	4	7	1		5	17
IGF-1	4	15	1	8	6	34
	4	6	2	2	7	21
	6	15		13	6	40
	4	11	2		5	22
TOTAL	23	56	7	27	36	149

Tabla 7 : *Número de ovocitos en estadios vesícula germinal, metafase I, anafase, metafase II y degenerados (con adición de beta - mercaptoetanol).*

TRATAMIENTO	VG	MI	A	MII	D	TOTAL
	4	3	2	3	2	14
	3	1	3	4	4	15
	6	5		3		14
BETA	2	2		7	5	16
	4	7	1	6	9	27
	1	14		6	6	27
	3	12		3	2	20
TOTAL	23	44	6	32	28	133

Tabla 8 : *Número de ovocitos en estadios vesícula germinal, metafase I, anafase, metafase II y degenerados (con adición de beta - mercaptoetanol + IGF - 1).*

TRATAMIENTO	VG	MI	A	MII	D	TOTAL
	2	8	2	2	7	21
	1	1	3	1	3	9
	4	7		4	5	20
B+IGF-1	4	8	3	3	6	24
	7	9	2	3	7	28
	4	10		5	8	27
		11		2	6	19
TOTAL	22	54	10	20	42	148

Anexo 2. Panel fotográfico



Fotografía 1. Obtención de ovarios de porcinas beneficiadas.



Fotografía 2. Ovarios de porcinas beneficiadas.



Fotografía 3. Ovarios en solución fisiológica y en baño María.



Fotografía 4. Recuperación de folículos.



Fotografía 5. Recuperación de folículos mediante punción.



Fotografía 6. Centrifugación de líquido folicular obtenido.



Fotografía 7. Selección de COCs



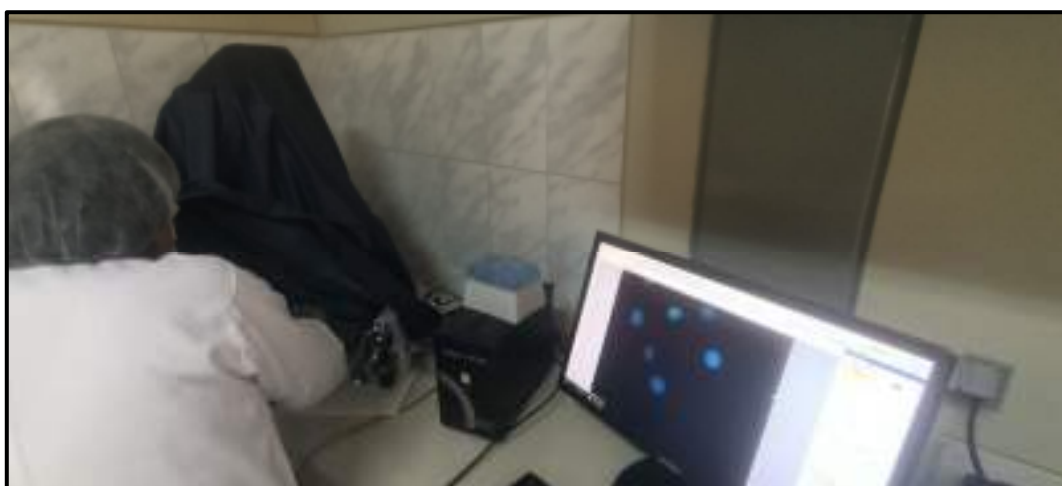
Fotografía 8. División de ovocitos en placa múltiple de 4 pocillos:
T1: TCM+ IGF-1, T2: TCM+BC, T3: TCM+ IGF-1+BC y T4: TCM sin
adición



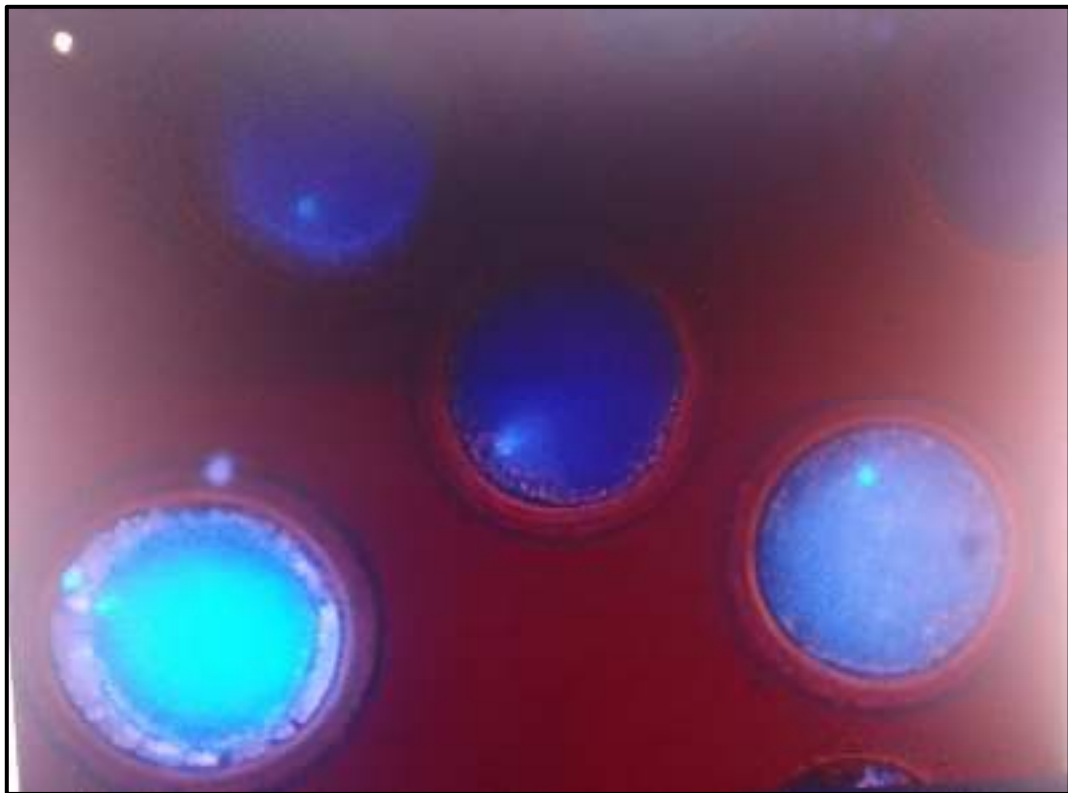
Fotografía 9. Maduración de ovocitos en incubadora



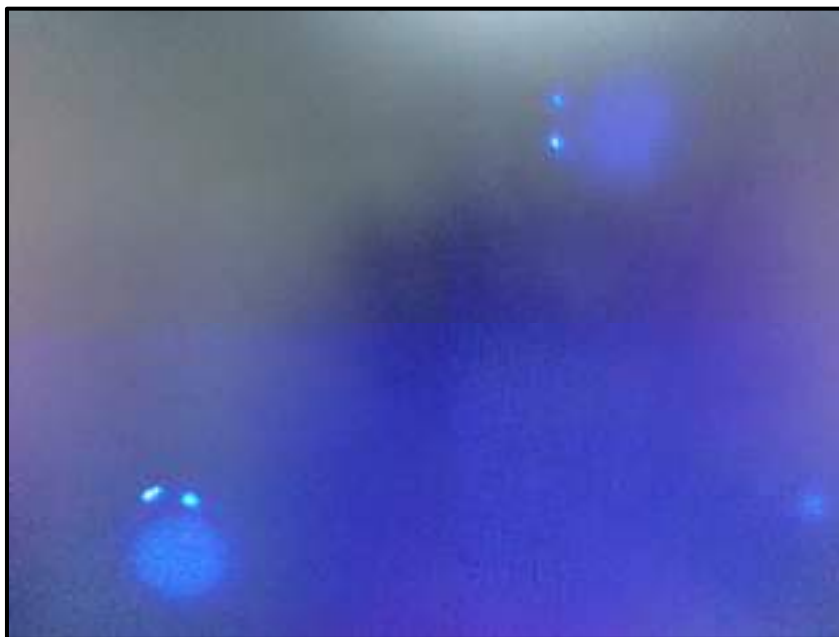
Fotografía 10. Tinción de ovocitos con Hoechst 33342; Sigma-Aldrich



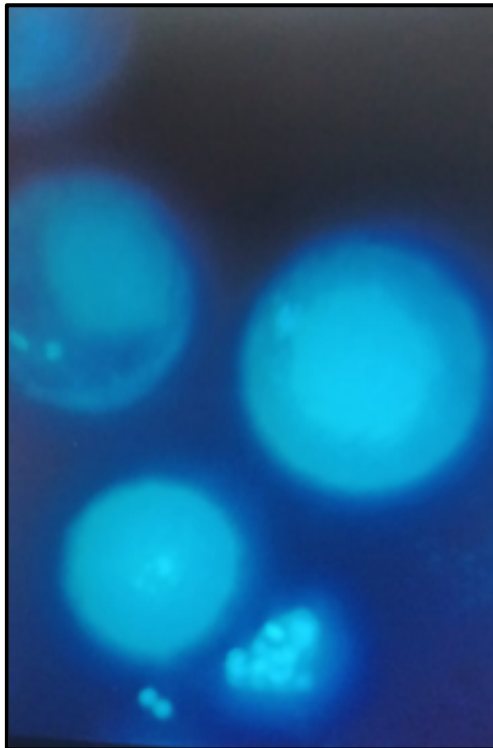
Fotografía 11. Observación y evaluación del estado meiótico de los ovocitos bajo un microscopio invertido fluorescente



Fotografía 12. Ovocitos en estados de metafase I en medio de IGF-1.



Fotografía 13. Ovocitos en estados de metafase II con la combinación
BETA + IGF-1



Fotografía 13. Ovocitos en estados de metafase II en medio de BETA

Anexo 3. Análisis estadístico para maduración in vitro de ovocitos de porcinos

El análisis estadístico utilizando el Software R versión 4.4.3

Objetivo 1: Efecto del IGF-1 en la maduración nuclear in vitro.

Para el análisis de los datos de este objetivo, los datos fueron importados con el nombre de `CvsF`

1.1. Análisis estadístico para Vesícula germinal según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsF$`VG%`)  
  
Shapiro-wilk normality test  
  
data: CvsF$`VG%`  
W = 0.96728, p-value = 0.8383
```

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen normalidad

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
LeveneTest(`VG%`~Tratamiento,data=CvsF)  
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)  
Df F value Pr(>F)  
group 1 1.7497 0.2106  
12
```

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos a analizar tienen homogeneidad de variancias

B. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

C. Prueba estadística: “t de Student”

```
t.test(`VG%`~Tratamiento,data=CvsF, alternative = c("two.sided"),
var.equal = T)

Two Sample t-test

data: VG% by Tratamiento
t = 2.0763, df = 12, p-value = 0.06001
alternative hypothesis: true difference in means between group Control and group IGF-1 is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.5852633 24.2960379
sample estimates:
mean in group Control mean in group IGF-1
25.94605 14.09067
```

D. Decisión: El valor de $P = 0.06001$ es mayor que 0.05.

1.2. Análisis para Metafase I según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsF$`MI%`)

Shapiro-wilk normality test

data: CvsF$`MI%`
W = 0.96448, p-value = 0.7956
El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los
datos tienen normalidad
```

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
leveneTest(`MI%`~Tratamiento,data=CvsF)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
Df F value Pr(>F)
group 1 1.3495 0.268
12
El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los
datos tienen homogeneidad de variancias
```

B. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

C. Prueba estadística: "t de Student"

```
t.test(`MI%`~Tratamiento,data=CvsF, alternative = c("two.sided"),
var.equal = T)

Two Sample t-test

data: MI% by Tratamiento
t = -1.7736, df = 12, p-value = 0.1015
alternative hypothesis: true difference in means between group Control and group IGF-1 is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -26.328887 2.699204
sample estimates:
mean in group Control mean in group IGF-1
 21.71357 33.52841
```

D. **Decisión:** El valor de $P = 0.1015$ es mayor que 0.05.

1.3. Análisis estadístico para Anafase según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsF$`A%`)

Shapiro-wilk normality test

data: CvsF$`A%`
W = 0.65491, p-value = 0.0001309
El valor de P es menor que 0.05, por tanto, se concluye que los
datos no tienen normalidad
```

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
leveneTest(`A%`~Tratamiento,data=CvsF)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
Df F value Pr(>F)
group 1 0.7217 0.4122
12
El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los
datos tienen homogeneidad de variancias
```

B. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

C. Prueba estadística: Prueba de Wilcoxon

```
wilcox.test(`A%`~Tratamiento,data=CvsF)

wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: A% by Tratamiento
```

```
w = 22, p-value = 0.7903
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

D. Decisión: El valor de P = 0.7903 es mayor que 0.05.

1.4. Análisis para Metafase II según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsF$`MII%`)
```

Shapiro-wilk normality test

```
data: CvsF$`MII%`
```

```
w = 0.93288, p-value = 0.3347
```

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen normalidad

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
leveneTest(`MII%`~Tratamiento,data=CvsF)
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

```
Df F value Pr(>F)
```

```
group 1 0.0644 0.804
```

```
12
```

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen homogeneidad de variancias

B. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

C. Prueba estadística: "t de Student"

```
t.test(`MII%`~Tratamiento,data=CvsF, alternative = c("two.sided"),
, var.equal = T)
```

Two Sample t-test

```
data: MII% by Tratamiento
```

```
t = 0.11805, df = 12, p-value = 0.908
```

```
alternative hypothesis: true difference in means between group Control and group IGF-1 is not equal to 0
```

```
95 percent confidence interval:
```

```
-15.61579 17.40484
```

```
sample estimates:
```

```
mean in group Control mean in group IGF-1
```

```
18.19578 17.30125
```

D. Decisión: El valor de $P = 0.908$ es mayor que 0.05.

1.5. Análisis para Degenerados según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsF$`D%`)
```

Shapiro-wilk normality test

data: CvsF\$`D%`

W = 0.88561, p-value = 0.06989

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen normalidad

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
LeveneTest(`D%`~Tratamiento,data=CvsF)
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

Df F value Pr(>F)

group 1 0.1955 0.6662

12

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen homogeneidad de variancias

B. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

C. Prueba estadística: "t de Student"

```
t.test(`D%`~Tratamiento,data=CvsF, alternative = c("two.sided"),  
var.equal = T)
```

Two Sample t-test

data: D% by Tratamiento

t = -0.64557, df = 12, p-value = 0.5307

alternative hypothesis: true difference in means between group Control and group IGF-1 is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-18.392349 9.984488

sample estimates:

mean in group Control mean in group IGF-1

25.36869 29.57262

D. Decisión: El valor de $P = 0.5307$ es mayor que 0.05.

OBJETIVO 2: Efecto del Beta-mercaptoetanol en la maduración nuclear in vitro

Para el análisis de los datos de este objetivo, los datos fueron importados con el nombre de CvsB

Nombre de Data = CvsB

2.1. Análisis para Vesícula germinal según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsB$`VG%`)
```

Shapiro-wilk normality test

data: CvsB\$`VG%`
W = 0.9555, p-value = 0.6488

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen normalidad. Para acotar, si el valor de P sea menor que 0.05 entonces concluiríamos que los datos no tienen normalidad.

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
leveneTest(`VG%`~Tratamiento,data=CvsB)
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
Df F value Pr(>F)
group 1 0.0788 0.7837
12

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen homogeneidad de variancias

B. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

C. Prueba estadística: "t de Student"

```
t.test(`VG%`~Tratamiento,data=CvsB, alternative = c("two.sided"),  
var.equal = T)
```

```

Two Sample t-test

data: VG% by Tratamiento
t = -0.91591, df = 12, p-value = 0.3778
alternative hypothesis: true difference in means between group Be
ta and group Control is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -21.323132 8.701622
sample estimates:
mean in group Beta mean in group Control
19.63530 25.94605

```

D. Decisión: El valor de $P = 0.3778$ es mayor que 0.05.

2.2. Análisis estadístico para Metafase I según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```

shapiro.test(CvsB$`MI%`)

Shapiro-wilk normality test

data: CvsB$`MI%`
W = 0.8881, p-value = 0.0759

```

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen normalidad

Prueba de homogeneidad de variancias:

```

LeveneTest(`MI%`~Tratamiento,data=CvsB)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
Df F value Pr(>F)
group 1 4.6352 0.05237 .
12
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen homogeneidad de variancias

B. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

C. Prueba estadística: “t de Student”

```

t.test(`MI%`~Tratamiento,data=CvsB, alternative = c("two.sided"),
, var.equal = T)

```

```

Two Sample t-test

data: MI% by Tratamiento
t = 1.1261, df = 12, p-value = 0.2821
alternative hypothesis: true difference in means between group Be
ta and group Control is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-8.29159 26.03225
sample estimates:
mean in group Beta mean in group Control
30.58390 21.71357

```

D. Decisión: El valor de $P = 0.2821$ es mayor que 0.05.

2.3. Análisis para Anafase según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```

shapiro.test(CvsB$`A%`)

Shapiro-wilk normality test

data: CvsB$`A%`
W = 0.67761, p-value = 0.0002187
El valor de P es menor que 0.05, por tanto, se concluye que los
datos no tienen normalidad

```

B. Decisión: El valor de $P = 0.0002187$ es menor que 0.05.

```

LeveneTest(`A%`~Tratamiento,data=CvsB)

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
Df F value Pr(>F)
group 1 0.2601 0.6193
12
El valor de P es menor que 0.05, por tanto, se concluye que los
datos tienen homogeneidad de variancias

```

C. Prueba de Wilcoxon, debido a que los datos resultaron sin normalidad, se realiza el análisis con la prueba de Wilcoxon

```

wilcox.test(`A%`~Tratamiento,data=CvsB, alternative = c("two.sided"))

wilcoxon rank sum test with continuity correction

```

```
data: A% by Tratamiento
w = 24, p-value = 1
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

2.4. Análisis para Metafase II según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsB$`MII%`)

Shapiro-wilk normality test

data: CvsB$`MII%`
w = 0.95828, p-value = 0.6947
El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los
datos tienen normalidad
El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los
datos tienen normalidad
```

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
leveneTest(`MII%`~Tratamiento,data=CvsB)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
Df F value Pr(>F)
group 1 1.3414 0.2693
12
El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los
datos tienen homogeneidad de variancias
```

B. Prueba de “t de Student”

```
t.test(`MII%`~Tratamiento,data=CvsB, alternative = c("two.sided"),
, var.equal = T)

Two Sample t-test

data: MII% by Tratamiento
t = 1.0195, df = 12, p-value = 0.3281
alternative hypothesis: true difference in means between group Bet
a and group Control is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-7.367353 20.323867
```

```
sample estimates:
mean in group Beta mean in group Control
24.67404 18.19578
```

C. Decisión: El valor de $P = 0.3281$ es mayor que 0.05, por tanto, no existe diferencia entre tratamientos.

2.5. Análisis para Degenerados según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsB$`D%`)

Shapiro-wilk normality test

data: CvsB$`D%`
W = 0.98191, p-value = 0.9844
```

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen normalidad

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
LeveneTest(`D%`~Tratamiento,data=CvsB)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
Df F value Pr(>F)
group 1 0.2627 0.6176
12
```

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen homogeneidad de variancias

B. Prueba de “t de Student”

```
t.test(`D%`~Tratamiento,data=CvsB, alternative = c("two.sided"),
var.equal = T)
```

```
Two Sample t-test

data: D% by Tratamiento
t = -0.93291, df = 12, p-value = 0.3693
alternative hypothesis: true difference in means between group Beta
and group Control is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-18.975613 7.597649
sample estimates:
```

```
mean in group Beta mean in group Control
19.67971 25.36869
```

C. **Decisión:** El valor de $P = 0.3693$ es mayor que 0.05, por tanto, no existe diferencia entre tratamientos.

OBJETIVO 3. Efecto del Beta-mercaptoetanol + IGF-1 en la maduración nuclear in vitro

Para el análisis de los datos de este objetivo, los datos fueron importados con el nombre de CvsBF

1.1. Análisis para Vesícula germinal según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsBF$`VG%`)
```

Shapiro-wilk normality test

```
data: CvsBF$`VG%`
```

```
W = 0.97166, p-value = 0.8981
```

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen normalidad

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
leveneTest(`VG%`~Tratamiento,data=CvsBF)
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

```
Df F value Pr(>F)
```

```
group 1 1.3934 0.2607
```

```
12
```

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen homogeneidad de variancias

A. Prueba de “t de Student”

```
t.test (`VG%`~Tratamiento,data=CvsBF, alternative = c("two.sided")  
, var.equal = T)
```

Two Sample t-test

```
data: VG% by Tratamiento  
t = -2.0804, df = 12, p-value = 0.05958  
alternative hypothesis: true difference in means between group B+I  
GF-1 and group Control is not equal to 0  
95 percent confidence interval:  
-24.7156364 0.5710722  
sample estimates:  
mean in group B+IGF-1 mean in group Control  
13.87377 25.94605
```

B. **Decisión:** El valor de P es $P = 0.05958$ mayor que 0.05, por tanto, no existe diferencia entre tratamientos.

3.2. Análisis para Metafase I según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsBF$`MI%`)
```

Shapiro-wilk normality test

```
data: CvsBF$`MI%`  
W = 0.9076, p-value = 0.1454
```

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen normalidad

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
LeveneTest(`MI%`~Tratamiento,data=CvsBF)
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

```
Df F value Pr(>F)  
group 1 0.6493 0.436  
12
```

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen homogeneidad de variancias

B. Prueba de “t de Student”

```
t.test(`MI%`~Tratamiento,data=CvsBF, alternative = c("two.sided"),
var.equal = T)

Two Sample t-test

data: MI% by Tratamiento
t = 2.311, df = 12, p-value = 0.03941
alternative hypothesis: true difference in means between group B+IGF-1 and group Control is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.756765 25.705900
sample estimates:
mean in group B+IGF-1 mean in group Control
34.94490 21.71357
```

C. **Decisión:** El valor de P= 0.03941 es menor que 0.05, por tanto, existe diferencia entre tratamientos.

3.3. Análisis para Anafase según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsBF$`A%`)

Shapiro-wilk normality test

data: CvsBF$`A%`
W = 0.71349, p-value = 0.0005115
El valor de P es menor que 0.05, por tanto, se concluye que los
datos no tienen normalidad
```

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
LeveneTest(`A%`~Tratamiento,data=CvsBF)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
Df F value Pr(>F)
group 1 0.0172 0.8977
```

12

El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos tienen homogeneidad de variancias

B. Prueba de Wilcoxon

```
wilcox.test(`A%`~Tratamiento,data=CvsBF)

wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: A% by Tratamiento
W = 27, p-value = 0.7849
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

C. **Decisión:** El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, no existe diferencia entre tratamientos.

Alternativamente se evaluó la Prueba de “t de Student”

```
t.test(`A%`~Tratamiento,data=CvsBF, alternative = c("two.sided"),
var.equal = T)

Two Sample t-test

data: A% by Tratamiento
t = 0.020855, df = 12, p-value = 0.9837
alternative hypothesis: true difference in means between group B+I
GF-1 and group Control is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-15.79622 16.10154
sample estimates:
mean in group B+IGF-1 mean in group Control
8.928571 8.775910
```

3.4. Análisis para Metafase II según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsBF$`MII%`)

Shapiro-wilk normality test

data: CvsBF$`MII%`
W = 0.86015, p-value = 0.0306
```

El valor de P es menor que 0.05, por tanto, se concluye que los datos no tienen normalidad

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
leveneTest(`MII%`~Tratamiento,data=CvsBF)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 1 3.92 0.07112 .
  12
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los
datos tienen homogeneidad de variancias
```

B. Prueba de “Wilcoxon”

```
wilcox.test(`MII%`~Tratamiento,data=CvsBF)

wilcoxon rank sum exact test

data: MII% by Tratamiento
W = 23, p-value = 0.9015
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

C. **Decisión:** El valor de P= 0.9015 es mayor que 0.05, por tanto, no existe diferencia entre tratamientos.

Prueba de “t de Student”

```
t.test(`MII%`~Tratamiento,data=CvsBF, alternative = c("two.sided"),
var.equal = T)

Two Sample t-test

data: MII% by Tratamiento
t = -0.88267, df = 12, p-value = 0.3948
alternative hypothesis: true difference in means between group B+I
GF-1 and group Control is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-17.08274 7.23234
sample estimates:
```

```
mean in group B+IGF-1 mean in group Control
13.27058 18.19578
```

3.5. Análisis para Degenerados según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad:

```
shapiro.test(CvsBF$`D%`)  
  
Shapiro-wilk normality test  
  
data: CvsBF$`D%`  
W = 0.93589, p-value = 0.3682  
El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los  
datos tienen normalidad
```

Prueba de homogeneidad de variancias:

```
leveneTest(`D%`~Tratamiento,data=CvsBF)  
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)  
Df F value Pr(>F)  
group 1 2.8881 0.115  
12  
El valor de P es mayor que 0.05, por tanto, se concluye que los  
datos tienen homogeneidad de variancias
```

B. Prueba de “t de Student”

```
t.test(`D%`~Tratamiento,data=CvsBF, alternative = c("two.sided"),  
var.equal = T)  
  
Two Sample t-test  
  
data: D% by Tratamiento  
t = 0.84459, df = 12, p-value = 0.4149  
alternative hypothesis: true difference in means between group B+I  
GF-1 and group Control is not equal to 0  
95 percent confidence interval:
```

```
-5.70831 12.93529
sample estimates:
mean in group B+IGF-1 mean in group Control
28.98218 25.36869
```

C. **Decisión:** El valor de $P = 0.4149$ es mayor que 0.05, por tanto, no existe diferencia entre tratamientos.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO SEGÚN TRATAMIENTOS

Para el análisis de los datos de este objetivo, los datos fueron importados con el nombre de Ale

4.1. Análisis para Vesícula germinal según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad

```
shapiro.test(Ale$`VG%`)
      Shapiro-wilk normality test
data: Ale$`VG%`
W = 0.94958, p-value = 0.1934
Prueba de Normalidad para los residuos
```

```
resv1<-residuals(v1)
shapiro.test(resv1)
      Shapiro-wilk normality test
data: resv1
W = 0.97099, p-value = 0.6074
```

Prueba de Homogeneidad de variancias

```
leveneTest(`VG%`~Tratamiento,data=Ale)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 3  0.6448 0.5938
    24
```

B. **Nivel de significancia:** $\alpha = 0.05$

C. **Prueba estadística:** Análisis de Variancia (ANVA)

```
v1=lm(`VG%`~Tratamiento,data=Ale)
anova(v1)
Analysis of Variance Table

Response: VG%
 Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tratamiento 3  682.68  227.56  2.0027 0.1405
Residuals 24 2727.03  113.63
```

D. **Decisión:** El valor de $P = 0.1405$ es mayor que 0.05, no se rechaza la hipótesis nula

4.2. Análisis estadístico para Metafase I según tratamientos

A. **Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias**

Prueba de Normalidad

```
shapiro.test(Ale$`MI%`)

Shapiro-wilk normality test

data: Ale$`MI%`
W = 0.98219, p-value = 0.8993

resm1<-residuals(m1)
shapiro.test(resm1)

Shapiro-wilk normality test

data: resm1
W = 0.9626, p-value = 0.4011
```

Prueba de Homogeneidad de Variancias

```
leveneTest(`MI%`~Tratamiento,data=Ale)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 3  1.3044 0.2959
  24
```

B. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

c. Prueba estadística: Análisis de Variancia (ANVA)

```
m1=lm(`MI%`~Tratamiento,data=Ale)
anova(m1)
Analysis of Variance Table

Response: MI%
  Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tratamiento 3  740.3   246.77   1.1108  0.3642
Residuals 24 5331.8   222.16
```

D. Decisión: El valor de $P = 0.3642$ es mayor que 0.05, no se rechaza la hipótesis nula

4.3. Análisis para Anafase según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad

```
shapiro.test(Ale$`A%`)
      Shapiro-wilk normality test

data:  Ale$`A%`
W = 0.72116, p-value = 5.753e-06
Prueba de normalidad de los residuos
```

```
resal<-residuals(a1)
shapiro.test(resal)
```

```
Shapiro-wilk normality test
data: resal
W = 0.79759, p-value = 9.683e-05
```

Prueba de Homogeneidad de Variancias

```
leveneTest(A% ~ Tratamiento, data=Ale)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
Df F value Pr(>F)
group 3 0.3809 0.7676
24
```

B. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

C. Prueba estadística: Prueba de Kruskal Wallis

```
kruskal.test(A% ~ Tratamiento, data=Ale)
Kruskal-Wallis rank sum test
data: A% by Tratamiento
kruskal-wallis chi-squared = 0.36707, df = 3, p-value = 0.947
```

D. Decisión: El valor de $P = 0.947$ es mayor que 0.05, no se rechaza la hipótesis nula

4.4. Análisis estadístico para Metafase II según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad

```
shapiro.test(Ale$`MII%`)
Shapiro-wilk normality test
data: Ale$`MII%`
W = 0.95586, p-value = 0.2771
```

```
resdca<-residuals(m2)
shapiro.test(resdca)

Shapiro-wilk normality test

data: resdca
W = 0.94994, p-value = 0.1974
```

Prueba de Homogeneidad de variancias

```
LeveneTest(`MII%`~Tratamiento,data=A1e)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
Df F value Pr(>F)
group 3 1.997 0.1413
24
```

B. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

C. Prueba estadística: Análisis de Variancia (ANVA)

```
m2=lm(`MII%`~Tratamiento,data=A1e)
anova(m2)
Analysis of variance Table

Response: MII%
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tratamiento 3 468.42 156.14 1.244 0.3158
Residuals 24 3012.41 125.52
```

D. Decisión: El valor de $P = 0.3158$ es mayor que 0.05, no se rechaza la hipótesis nula

4.5. Análisis estadístico para Degenerados según tratamientos

A. Verificación de supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Variancias

Prueba de Normalidad

```
shapiro.test(Ale$`D%`)

      Shapiro-wilk normality test

data: Ale$`D%`
W = 0.95263, p-value = 0.2305
```

```
resd1<-residuals(d1)
shapiro.test(resd1)

      Shapiro-wilk normality test

data: resd1
W = 0.96735, p-value = 0.5116
```

Prueba de homogeneidad de variancias

```
leveneTest(`D%`~Tratamiento,data=Ale)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 3 1.4028 0.2663
      24
```

B. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

C. Prueba estadística: Análisis de Variancia (ANVA)

```
d1=lm(`D%`~Tratamiento,data=Ale)
anova(d1)
Analysis of variance Table

Response: D%
  Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tratamiento 3 433.74 144.58 1.2575 0.3112
Residuals 24 2759.31 114.97
```

D. Decisión: El valor de $P = 0.5116$ es mayor que 0.05, no se rechaza la hipótesis nula

