

# **UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

## **EFFECTO DE LOS SUPLEMENTOS FLUIDO FOLICULAR Y SUERO FETAL BOVINO SOBRE LA MADURACIÓN *IN* *VITRO* DE OVOCITOS PORCINOS**

**TESIS**

**Presentada por:**

Bach. JHON LEE LUPACA ARIAS

**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**

**EFFECTO DE LOS SUPLEMENTOS FLUIDO FOLICULAR Y SUERO FETAL  
BOVINO SOBRE LA MADURACION *IN VITRO* DE OVOCITOS PORCINOS**

Tesis sustentada y aprobada el día 25 de marzo del 2026; siendo el jurado calificador:

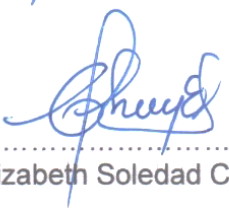
PRESIDENTE

  
:.....  
Dr. Daniel Gandarillas Espezúa

SECRETARIO

  
:.....  
Dra. Rosario del Pilar Telles Velásquez

VOCAL

  
:.....  
Dra. Elizabeth Soledad Chucuya Mamani

ASESOR

  
:.....  
Dra. Elizabeth Soledad Chucuya Mamani

## CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dra. Elizabeth Soledad Chucuya Mamani, en mi condición de asesora acreditada por la Resolución de Facultad N° 8984-2024-FCAG del trabajo de tesis titulado: **“EFECTO DE LOS SUPLEMENTOS FLÚIDO FOLICULAR Y SUERO FETAL BOVINO SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS PORCINOS”**, presentada por el Bachiller JHON LEE LUPACA ARIAS 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 y está de acuerdo al nivel **PERMITIDO**, para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

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

Tacna, 27 de abril del 2026

FIRMA ASESOR

Nombres y apellidos

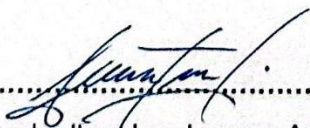


.....  
Dra. Elizabeth Soledad Chucuya Mamani  
DNI N° 42044736



FIRMA TESISTA

Nombres y apellidos



.....  
Bach. Jhon Lee Lupaca Arias  
DNI N° 73047517



## **DEDICATORIA**

*A Dios por estar siempre conmigo, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.*

*A mi hermana Helia, que nos cuida, protege y vela por nosotros desde el cielo.*

*A mi esposa Isabel, por su paciencia y apoyo incondicional durante todo el tiempo invertido en el proyecto de tesis.*

*A mis padres Socrates y Rufilia por darme la vida y hacer todo esto posible.*

## **AGRADECIMIENTO**

*A mi casa de estudios, la EMVZ de la UNJBG, por todas las experiencias y conocimientos en el transcurso de los años en mi estancia universitaria.*

*A mi Asesora Dra. Elizabeth Soledad Chucuya Mamani, por su apoyo, sus ánimos, su empuje y así brindarme todas las facilidades brindadas.*

*A la MVZ Angelina Puma Iquise, por todo el apoyo en la etapa procedimental (en el laboratorio) de la investigación.*

*Al Proyecto “ROL DEL ANTIOXIDANTE CLORHIDRATO DE TRIS (2-CARBOXIETIL) FOSFINA (TCEP) EN LA CRIOTOLERANCIA DE OVOCITOS Y SU POTENCIAL DE DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO EN PORCINO (*Sus scrofa domesticus*)”, proyecto ganador mediante Resolución Rectoral N.º 10979-2023-UN/JBG, con fuente de financiamiento proveniente de los fondos del Canon, Sobrecañon y Regalías Mineras de la UNJBG Tacna.*

*Al equipo del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, por proporcionarme su tiempo apoyándome para el desarrollo de la tesis.*

*A Isabel, mi esposa, por ser parte fundamental durante todo el proceso de esta investigación, gracias por su comprensión y paciencia.*

*A todo el equipo de Jurados, que me incentivaron y asistieron en las correcciones del proyecto de investigación.*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|                                        |      |
|----------------------------------------|------|
| DEDICATORIA                            | iv   |
| AGRADECIMIENTO                         | v    |
| ÍNDICE DE TABLAS                       | viii |
| ACRÓNIMOS                              | ix   |
| RESUMEN                                | x    |
| ABSTRACT                               | xi   |
| INTRODUCCIÓN                           | 1    |
| CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 3    |
| 1.1. Descripción del problema          | 3    |
| 1.2. Justificación                     | 5    |
| 1.3. Objetivos                         | 8    |
| 1.3.1. Objetivos generales             | 7    |
| 1.3.2. Objetivos específicos           | 8    |
| 1.4. Hipótesis                         | 8    |
| CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO             | 9    |
| 2.1. Antecedentes                      | 9    |
| 2.2. Base teórica                      | 13   |
| 2.3. Conceptos básicos                 | 34   |

|                                          |    |
|------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS       | 35 |
| 3.1. Materiales                          | 35 |
| 3.1.1. Ubicación geográfica y temporal   | 35 |
| 3.1.2. Población y muestra               | 35 |
| 3.1.3. Materiales                        | 37 |
| 3.2. Método                              | 37 |
| 3.2.1. Tipo y diseño de la investigación | 37 |
| 3.2.2. Diseño procedimental              | 38 |
| 3.2.3. Análisis de datos                 | 41 |
| CÁPITULO IV: RESULTADOS                  | 42 |
| CAPÍTULO V: DISCUSIÓN                    | 56 |
| CONCLUSIONES                             | 63 |
| RECOMENDACIONES                          | 64 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS               | 65 |
| ANEXOS                                   | 77 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Diseño procedimental                                                                                                      | 38 |
| Tabla 2. Resultados de recuperación de cocs                                                                                        | 42 |
| Tabla 3. Resultados de estadíos de maduración in vitro de los grupos FF,<br>SFB y control, expresados en porcentajes (%)           | 43 |
| Tabla 4. Resultados de estadíos de maduración in vitro del fluido folicular y<br>grupo control expresados en porcentajes (%)       | 45 |
| Tabla 5. Resultados de estadíos de maduración in vitro del suero fetal bovino<br>y el grupo control, expresados en porcentajes (%) | 48 |
| Tabla 6. Prueba de normalidad para el número de ovocitos en cada estadío<br>de maduración                                          | 50 |
| Tabla 7. Prueba de anova entre los tratamientos y el grupo de control en<br>cada estadío de maduración                             | 52 |
| Tabla 8. Prueba de Dunnett entre los tratamientos y el grupo de control en<br>cada estadío de maduración                           | 54 |

## **ACRÓNIMOS**

**ARN:** ácido ribonucleico

**BSA:** albúmina sérica bovina

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**COCs:** complejos ovocito-células del cúmulo

**E<sub>2</sub>:** estrógenos

**FCE:** factor de crecimiento epidérmico

**FIV:** fecundación in vitro

**FF:** fluido folicular

**FO:** fluido oviductal

**FSH:** hormona folículo estimulante

**hCG:** gonadotropina coriónica humana

**LH:** hormona luteinizante

**MIV:** maduración de embriones in vitro

**PIV:** producción de embriones in vitro

**SFB:** suero fetal bovino

## RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo principal de evaluar el efecto de la adición de fluido folicular y el suero fetal bovino en el medio de maduración in vitro de ovocitos de porcinos, para tal investigación se recolectaron 1003 folículos de los cuales se aspiraron de 169 ovarios. De estos, 708 COCs fueron seleccionados, recuperados y clasificados en categorías A, B y C, los cuales fueron distribuidos en 3 tratamientos: T1 (TCM+PVA al 0,1 %) T2 (TCM+10 % de SFB) T3 (TCM+10 % de FF). Los resultados mostraron que el SFB redujo el porcentaje de ovocitos en vesícula germinal, obteniendo un 30,37 %, de igual forma redujo el porcentaje de ovocitos de Metafase I, obteniendo un 20,41 %, el porcentaje de ovocitos en metafase II tuvo una mejora muy marcada, obteniendo un 30,37 %, e incrementó la degeneración hasta un 18,85 %. El FF redujo el porcentaje de ovocitos en vesícula germinal, obteniendo un 37,36 %, se disminuyó en Metafase I a un 24,70 %, elevó considerablemente el porcentaje en Metafase II, obteniéndose un 30,00 %, y el porcentaje de degenerados incremento a un a un 20,00% Estos resultados sugieren que tanto el SFB como el FF favorecen la maduración nuclear in vitro de ovocitos porcinos.

**Palabras clave:** fluido folicular, suero fetal bovino, biotecnología reproductiva, maduración in vitro, ovocitos porcinos

## ABSTRACT

This study was conducted with the primary objective of evaluating the effect of adding follicular fluid and bovine fetal serum to the in vitro maturation medium for porcine oocytes. For this study, 1,003 follicles were collected, 169 of which were aspirated from ovaries. Of these, 708 COCs were selected, recovered, and classified into categories A, B, and C, which were distributed across 3 treatments: T1 (TCM + 0,1 % PVA), T2 (TCM + 10 % FBS), and T3 (TCM + 10 % FF). The results showed that SFB reduced the percentage of oocytes in the germinal vesicle to 30.37%, it also reduced the percentage of oocytes in metaphase I to 20,41 %; the percentage of oocytes in metaphase II showed a marked improvement, reaching 30,37 %; and degeneration increased to 18,85 %. FF reduced the percentage of oocytes in the germinal vesicle to 37.36%, decreased the percentage in Metaphase I to 24,70 %, and significantly increased the percentage in Metaphase II to 30,00 %, and the percentage of degenerated oocytes increased to 20,00 %. These results suggest that both SFB and FF promote the in vitro nuclear maturation of porcine oocytes.

**Keywords:** follicular fluid, fetal bovine serum, reproductive biotechnology, in vitro maturation, porcine oocytes.

## **INTRODUCCIÓN**

La población mundial basada en su incremento y el crecimiento de la demanda de alimentos ocasiona presiones sobre los recursos de la naturaleza. El ser humano ha elaborado aptitudes cada vez mejores para permitirle, abastecerse de productos alimenticios. Uno de los sectores clave para dicho fin basados en tecnificación es la ganadería y la biotecnología se apunta como ruta de esperanza; además, es latente (Urrego y Restrepo, 2006) la reducción de importaciones de productos de origen animal, para lo cual es necesario incrementar tecnología en producciones rurales para hacerlas competitivas (Vivanco, 2007).

La biotecnología animal ha logrado un significativo avance, alcanzando un control reproductivo y control genético alcanzando puntos como la clonación y la transgénesis (Hansen, 2006). Muchos campos lograron resultados de dichos estudios, contando con una literatura muy amplia.

La clonación de embriones porcinos tuvo un avance significativo, pero aún existen dificultades, siendo más resaltantes en los en embriones provenientes de la maduración in vitro. El factor determinante no ha sido

identificado aun, ello hace necesario investigar procesos distintos, tanto en maduración, clonación y transgénesis, para poder lograr un estándar de calidad en la producción de embriones (Hansen, 2006).

Existen funciones fisiológicas similares entre humanos y cerdos, ello permite realizar investigaciones biomédicas en el área de genotransplantes, pero esto sigue siendo un reto por la carencia en la producción *in vitro* de ovocitos con calidad necesaria (Gil et al., 2010).

En consecuencia, el presente estudio tuvo como objetivo principal determinar el efecto de la suplementación con fluido folicular y suero fetal bovino sobre el proceso de maduración *in vitro* de ovocitos porcinos. Y de esa manera aportar conocimientos sobre estandarización del procedimiento en la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos.

## **CAPÍTULO I**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **1.1. Descripción del problema**

La maduración in vitro de ovocitos porcinos es una etapa de vital importancia dentro de las diferentes biotecnologías reproductivas, ya que afecta de manera directa al éxito de la fecundación in vitro y el desarrollo embrionario posterior. Para lograr un proceso adecuado y eficiente, el medio de cultivo tiene que imitar las condiciones fisiológicas presentes en el folículo ovárico, proporcionando al ovocito los nutrientes, hormonas, factores de crecimiento y condiciones necesarias para lograr una maduración nuclear y citoplasmática óptima. Es por ello que los suplementos adicionados al medio de maduración tienen la importancia para lograr calidad y viabilidad del ovocito (Gruppen, 2014).

Entre los suplementos más usados para este proceso se encuentran el suero fetal bovino y el fluido folicular (Tesfaye et al., 2022). El suero fetal bovino (SFB) se emplea debido a la composición de su contenido, siendo fuente de proteínas, aminoácidos, vitaminas, lípidos, factores de crecimiento y moléculas transportadoras, todo ello favorece la viabilidad celular, el

metabolismo ovocitario y la conexión ovocitaria y los COCs. Su importancia se centra en su capacidad para promover la viabilidad ovocitaria y aumentar el porcentaje de ovocitos que alcanzan la metafase II, lo que lo convierte en un suplemento clave en protocolos de maduración ovocitaria. No obstante, su origen y su composición podrían generar respuestas diferenciadas a lo largo del proceso denominado maduración in vitro, alterando la uniformidad y calidad de los resultados finales. De igual forma, el fluido folicular otorga un ambiente fisiológico natural del ovocito, ya que contiene hormonas esteroideas, gonadotropinas, factores de crecimiento, antioxidantes y metabolitos esenciales que participan activamente en el crecimiento y la maduración ovocitaria (Algriany et al., 2004). El uso de fluido folicular como suplemento podría favorecer una maduración más cercana a las condiciones in vivo, mejorando la maduración del ovocito. Su importancia radica en su capacidad para estimular la maduración nuclear y contribuir a la calidad funcional del ovocito, aunque su efectividad puede variar en función del origen y composición del fluido folicular.

El proceso de maduración del citoplasma ovárico porcino podría optimizarse a través de la disminución del estrés oxidativo generado por la

acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales crean un entorno desfavorable durante la maduración *in vitro* (Tatemoto et al., 2000).

A pesar del conocimiento de estos suplementos, existe limitada información comparativa, especialmente a nivel local, sobre el efecto específico del FF y del SFB en la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos. Esta falta de evidencia dificulta la selección del suplemento más adecuado para optimizar los protocolos de maduración *in vitro* (Krisher, 2004). En este sentido, surge la necesidad de evaluar el efecto de ambos suplementos sobre la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos, con el propósito de obtener información científica capaz de contribuir en la mejora de los procedimientos de biotecnología reproductiva y fortalecer el conocimiento en el ámbito académico y productivo.

## **1.2. Justificación**

El trabajo de investigación tuvo como finalidad fomentar el estudio de las características de los suplementos para la maduración *in vitro* de ovocitos; en consecuencia, la presente investigación se orientó a evaluar el efecto de dos suplementos en la maduración *in vitro* de ovocitos de porcinos.

La producción de embriones inicia con la maduración in vitro de ovocitos, así también como el estudio de células madre, la obtención de animales transgénicos y la clonación (Kakkaresy et al., 2010).

La biotecnología reproductiva brinda variedad de aplicación en especies como el porcino, llegando a estudiar células madres obtenidas de blastocitos porcinos, siendo de gran importancia en la aplicación sobre enfermedad comunes en humanos. (Donglin et al., 2023), para alcanzar la obtención de células madre, es necesaria la fertilización in vitro de ovocitos.

En el aspecto biomédico y productividad, el porcino es de gran importancia, es por ellos que las mejoras reproductivas de la mano del manejo de genes logran el mejoramiento genético, el cual puede aplicarse en mejoramiento productivo del porcino o en estudios de transgénesis. (Marinone et al., 2018).

La producción in vitro embrionario o estudios similares son escasos en nuestro país, es por ello que nuestro estudio busca aportar en la biotecnología reproductiva, específicamente en los medios de maduración, y se esa forma

conseguir mejores resultados en el momento de realizar estudios referentes a porcinos.

De la misma forma, se estima que nuestro estudio es de utilidad para áreas de investigación en la elaboración de protocolos adecuados sin la necesidad de productos escasos o no disponibles.

El estudio tuvo como objetivo comparar el efecto de la adición de fluido folicular y el suero fetal bovino en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos porcinos. Además, los resultados obtenidos serán de mucha ayuda para próximas investigaciones similares, porque permite obtener información de la maduración *in vitro*, en todas las fases del desarrollo embrionario.

Desde el punto de vista metodológico se obtuvieron ovarios para la recuperación por punción de los COCs, los cuales fueron clasificados para posteriormente adicionar fluido folicular y suero fetal bovino, luego se sometieron a la maduración *in vitro*, finalmente pasaron por la tinción para observarlos en el microscopio de fluorescencia.

El trabajo de investigación tuvo como finalidad fomentar el estudio sobre los suplementos usados en la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivos generales**

- Comparar el efecto de la adición de fluido folicular y el suero fetal bovino al medio de maduración *in vitro* de ovocitos de porcinos

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Determinar el efecto del suplemento fluido folicular al medio de maduración *in vitro* de ovocitos de porcinos.
- Determinar el efecto del suplemento suero fetal bovino al medio de maduración *in vitro* de ovocitos de porcinos.

### **1.4. Hipótesis**

#### **1.4.1. Hipótesis de investigación**

**H<sub>0</sub>:** La adición de suplementos como fluido folicular y suero fetal bovino no tiene efectos significativos sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de porcinos.

**H<sub>1</sub>:** La adición de suplementos como fluido folicular y suero fetal bovino tiene efectos significativos sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de porcinos.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. Antecedentes**

##### **2.1.1. Internacionales**

Restrepo et al. (2011) en Colombia (Antioquia), Evaluaron el efecto de dos suplementos fluido folicular y suero fetal bovino sobre la maduración in vitro de oocitos equinos. Ambos fueron incorporados de manera individual en una concentración del 20 %, en medio Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) el cual fue suplementado adicionalmente con ganadotropinas, hormona folículo estimulante y luteinizante (FSH y LH), antibióticos, glutamina, insulina, transferrina y selenio. Los ovocitos fueron cultivados en grupos de 5 durante 36 horas bajo condiciones controladas de 39°C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad relativa. Los resultados obtenidos mostraron un mayor porcentaje de expansión celular del cumulo en los oocitos tratados con suero fetal bovino (47,5 %), en comparación con aquellos suplementados con fluido folicular (16,2 %). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes totales de maduración in vitro (MIV) entre ambos tratamientos.

Restrepo et al. (2007) en Colombia (Medellín), evaluó el efecto de la suplementación con suero fetal bovino durante la maduración in vitro de oocitos bovinos sobre su actividad mitocondrial y posterior desarrollo in vitro. Realizaron la maduración in vitro en medio Syntetic Oviduct Fluid (SOF) de calidad (aa) en tratamientos en presencia o ausencia de suero fetal bovino. Posteriormente, los ovocitos fueron fertilizados y cultivados in vitro con el fin de evaluar sus tasas de desarrollo hasta el estadio de mórula. Las comparaciones entre los tratamientos se realizaron mediante la prueba t de Student. Los resultados mostraron una mayor proporción de actividad mitocondrial en los ovocitos madurados en un medio libre de suero ( $44,4 \pm 1,82 \%$ ) en comparación con aquellos cultivados en presencia de suero ( $31,2 \pm 1,429$ ), evidenciándose diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

Argudo et al. (2018) en Ecuador (Guayaquil), determinó el efecto del fluido folicular porcino en la maduración in vitro de complejos cumulo-ovocitos (COC's) obtenidos de cerdas prepúberes. A partir de los cuales se aislaron los COC's, así como el fluido folicular porcino. Los COC's de calidad excelente y buena ( $n = 245$ ) fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos experimentales, a los que se les adicionó diferentes concentraciones de fluido

folicular: 0 % (n = 79), 10 % (n = 94) y 20 % (n = 72). Posteriormente, fueron incubados durante 48 horas. Los resultados evidenciaron que el grupo sin suplementación (0 %) presentó una menor tasa de maduración ( $21,33 \pm 1,4$  %) en comparación con los grupos suplementados con 10 % ( $51,53 \pm 3,4$  %) y 20 % ( $52,93 \pm 5,7$  %), observándose diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

### **2.1.2. Nacionales**

Castro (2018) en Lima, Evaluó el efecto del fluido folicular como suplemento en el medio de maduración sobre las tasas de maduración in vitro de ovocitos de alpaca. Los complejos cumulus-oophorus (CCO) fueron colocados en un medio de maduración suplementado con suero fetal bovino (SFB), fluido folicular (FF) o ambos (SFB+FF) y cultivados a 38,5 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad relativa durante 32 a 36 horas. La madurez ovocitaria fue determinada posterior al cultivo mediante la identificación del primer cuerpo polar. Los resultados evidenciaron un promedio de maduración del 25 % en los CCO tratados únicamente con SFB, mientras que los grupos suplementados con FF y con la combinación SFB+FF presentaron promedios de 24,7 % y 19,2 %, respectivamente.

Onofre (2019) en Huancayo, evaluó la maduración in vitro de ovocitos de alpaca adicionando suero fetal de alpaca al medio de maduración, se obtuvieron ovario del camal municipal de Huancavelica, siendo un total de 110 ovarios, posteriormente se llevaron las muestras al laboratorio para ser aspirados. Se obtuvieron 431 ovocitos (I Y II) y se cultivaron en medio de maduración Tissue Culture Medium-199 (TCM 199) con hormona folículo estimulante (FSH), piruvato de sodio, antibiótico (gentamicina), hormona (estradiol) además de diferentes concentraciones de suero folicular (SFA: 10 %, 15 % y 20 %) y suero fetal bovino (SFB: 10 %). El cultivo se realizó durante 26 horas a 38,5°C. obteniéndose (10 % SFA) 35,16 %, (15 % SFA) 32,32 %, (20 % SFA) 37,07 % Y (10 % SFB) 20,00 %).

### **2.1.3. Antecedentes locales**

Limache (2015) en Tacna, evaluó el medio de maduración añadiendo fluido folicular para la obtención de embriones bovinos in vitro. Se obtuvieron muestras para posteriormente obtener ovocitos inmaduros y llevarlos a maduración distribuyéndolos aleatoriamente en 2 grupos: Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) + Hormonas y TCM-199 + fluido folicular (FF), los cuales se sometieron a maduración in vitro por un lapso de 24 horas. Los

resultados de la maduración in vitro de ovocitos obtenidos transcurrido el tiempo establecido fueron los siguientes: TCM + H 58 %; TCM + FF 54 %.

El parámetro temporal para una maduración in vitro optima es aún indefinida, ello lo podemos corroborar con los estudios citados en nuestra investigación, las diferencias son irregulares e insuficientes como para poder definir un protocolo en cuanto a maduración in vitro.

## **2.2. Base teórica**

### ***2.2.1. Aspectos generales del desarrollo del ovocito***

Para lograr la preparación del ovocito para una fecundación exitosa y asegurar el desarrollo embrionario, se deben lograr modificaciones citoplasmáticas y nucleares. La línea germinal aparece y con ella las células primordiales, las cuales posteriormente darán lugar al cúmulo. (Sánchez, 2000) los espermatozoides se encargan de degradar el cumulo mediante producción enzimática (Arthur y Noakes, 2003).

Las estructuras celulares se dan con el crecimiento del ovocito, el cual sufre cambios en su estructura, pasando de difuso a denso. (Azada, 2000).

### **2.2.2. Estructura del ovocito**

#### **Zona pelúcida**

Se refiere a la membrana que recubre al ovocito. Su composición es a base de glicoproteínas, las cuales tienen propiedades funcionales e inmunológicas, estas glicoproteínas forman la membrana de 0,015 mm de grosor aproximadamente (Laing et al., 2006).

#### **Membrana plasmática**

Es una membrana conformada de proteínas en forma de fibras, cuyos receptores facilitan la captación de esperma, también cumple una función de equilibrio intracelular y extracelular, similares a la célula eucariota (Bayer, 2010).

#### **Pronúcleo ovular**

Es la parte central del ovocito y en ella se aloja gran parte del código genético. Al momento de lograrse la fecundación, este se fusiona con el pronúcleo espermático y forman el núcleo del cigoto (Alvariño y Ubilla, 2003).

#### **Gránulos corticales**

Se encuentran en la parte interna de la membrana del ovulo y tienen una forma vesicular, su tamaño varía entre 0,3 a 0,5 micras, después de la fecundación, estas se fusionan con la membrana para evitar la entrada de otros espermatozoides al interior dl ovulo. (Hafez, 2002).

### **Espacio perivitelino**

Se refiere al espacio entre la zona pelúcida y el ovocito, y es en este espacio donde sucede la liberación de cuerpos polares durante la maduración, su espesor varía entre 0,2 y 0,4 micras (Cabodevila y Teruel, 2001).

### **2.2.3. Ovogénesis**

En las hembras de los mamíferos, los órganos reproductores son los ovarios, productores de los gametos femeninos que son los ovocitos y de las hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progestágenos).

Es una secuencia de procesos como diferenciación, crecimiento y maduración celular. Posteriormente ocurre el desarrollo embrionario. (Gilbert, 2005). Es en este proceso donde ocurre la progresión del ciclo, la meiosis se completa, es por ello que la ovogénesis es crucial. (Van Woudenberg et al., 2012).

El inicio de la ovogénesis se da en las células primordiales y culminan con los ovocitos en metafase II (Gigli et al., 2006).

Los ovocitos primarios dan el ciclo a la meiosis, logrando otra división celular y dando lugar al cuerpo polar y al ovocito secundario (Gilbert, 2005).

Posterior a ello ocurre la segunda división celular, el citoplasma mantiene sus estructuras y libera el segundo cuerpo polar (Gilbert, 2005).

#### **2.2.4. Folículo y foliculogénesis**

Es la unidad estructural del ovario, se refiere al ovocito inmaduro y sus capas celulares externas diploides como la granulosa y la teca (Gigli et al., 2006) (Hutt y Albertini, 2007).

En otro contexto, la foliculogénesis se refiere a la formación, crecimiento y diferenciación del folículo (Gigli et al., 2006), cuya función principal es obtener un folículo maduro (Combelles, 2013). Esto ocurre en dos fases: la fase primaria es de formación y crecimiento de folículos primordiales, primarios y secundarios, la fase secundaria se refiere a la formación de folículos preovulatorios (Araújo et al., 2014).

- **Folículo primordial**

Se encuentran almacenados en los ovarios y se protegen con la membrana basal y células de la granulosa. (Gilbert, 2005) (Hutt y Albertini, 2007). Los folículos primordiales se forman en la meiosis, durante el paquíteno y el diploteno (Gilbert, 2005).

Estos se liberan de manera periódica para su posterior crecimiento (Hutt y Albertini, 2007).

- **Folículo primario**

Posterior al inicio de la activación celular de los primordiales, surgen los folículos primarios rodeados de células cuboides de una sola capa (Gilbert, 2005).

- **Folículo secundario**

La característica principal de un folículo secundario es su capa de granulosa conformada por 2 o más capas. Es en esta etapa donde inicia la formación de la zona pelúcida, las tecas, la síntesis de ARN (Gilbert, 2005).

- **Folículo terciario o pre-antral**

Una interacción del ovocito con las células de la granulosa da lugar al folículo pre-antral, y así lograr la producción hormonal (Hutt y Albertini, 2007).

Se completa la meiosis y la formación de la zona pelúcida, el ovocito incrementa su tamaño y produce fluido folicular en la cavidad antral (Hutt y albertini, 2007).

- **Folículo antral o folículo de De Graff**

Es la etapa final del desarrollo folicular, en esta etapa el antro folicular se encuentra completamente lleno de fluido folicular, y aparecen las células del cumulus que se ubican rodeando al CCO, también se hace presente una lámina vascularizada formada de células, es decir, la teca (Combelles, 2013). Las hormonas desencadenan este estadio, teniendo como resultado la liberación de un ovocito con facultades de madurez. (Gilbert, 2005) (Hutt y Albertini, 2007). También se inician las interacciones entre las células del cumulus y el ovocito (Gilbert, 2005) (Hutt y Albertini, 2007).

#### ***2.2.5. Dinámica folicular del porcino***

En el porcino se comprenden 2 procesos: el primero es el reclutamiento folicular y el segundo es la selección folicular (Foxcroft et al., 1985). Todo inicia cuando el folículo alcanza 1mm de diámetro, ubicándose estas en la superficie ovárica, sus dimensiones varían entre 1 a 56 mm (Foxcroft et al., 1985).

El número de folículos en el porcino es superior a otras especies domésticas (Evans, 2003). El número visible de folículos es variable entre 30 a 90 folículos. (Guthrie et al., 1995). El número de folículos de menor tamaño se reduce, para quedar únicamente folículos ovulatorios. (Guthrie et al., 1995). Cuyo tamaño es de 7 a 710 mm antes de iniciar la ovulación (Dalin et al., 1995). Ya que en la fase luteal se coordinan los factores referentes al desarrollo (Guthrie et al., 1995). La atresia folicular es regular en esta etapa, así como también el crecimiento folicular (Guthrie et al., 1995) todo ello sin depender de la cantidad de hormonas en el citoplasma. (Guthrie et al., 1995). La producción hormonal se da por el cuerpo luteo, las cuales regulan dichas concentraciones aptas para la captación folicular, lo cual se asocia a la falta de maduración durante a pase luteal. (Driancourt, 2001). El tamaño folicular de los folículos que lograron liberarse se aumenta hasta el día 16 del ciclo estral (Cox, 1997).

Los folículos antrales atrapan a los folículos ovulatorios durante la fase luteal, los cambios hormonales se evidencian originando un incremento de LH y FSH y reduciendo la progesterona, esto solo sucede con los folículos de mayor tamaño y ocurre la atresia celular con los más pequeños. (Soede et al., 2007).

Ocurre también una evidente diferencia en el crecimiento y maduración folicular a causa de la dominancia, y se refleja en la captación más eficiente de folículos dominantes y una captación prácticamente nula de folículos pequeños (Driancourt, 2001).

#### ***2.2.6. Interacción ovocito – células de la granulosa***

Se define como una interacción paracrina entre la célula ovocitaria y las estructuras celulares que conforman la capa granulosa, estas interacciones están sujetas a un cambio con relación al tiempo, pero logrando la maduración del ovocito (Dumesic et al., 2015).

Al momento de iniciarse la foliculogénesis se observan contactos específicos en los ovocitos llamados proyecciones trans-zonales (Hutt y Albertini, 2007). Estos procesos citoplasmáticos se componen de estructuras tubulares y filamentosas que logran una comunicación fisiológica entre la capa celular de la granulosa con el ovocito.

Estas estructuras transportan nutrientes y otras moléculas entre estas 2 partes. (Hutt y Albertini, 2007).

El mantenimiento del ovocito está a cargo de las células de la granulosa, mediante el intercambio nutricional y hormonal que permiten una maduración

adecuada del ovocito (Hutt y Albertini, 2007) (Kakkaresy et al., 2010) (Wigglesworth et al., 2013) (Casillas et al., 2014). Los compuestos que ayudan en la maduración meiótica, se dan por parte de las células del cumulus, y la acción es más notoria en folículos antrales de dimensiones adecuadas, lo folículos pequeños no logran este proceso (Silva et al., 2016).

El crecimiento folicular es dominado por el ovocito, pero necesita del complemento de otros factores, logrando un reclutamiento de células en la teca y otros componentes extracelulares (Dias et al., 2014) (Casillas et al., 2015).

#### ***2.2.7. Maduración IN VIVO del ovocito***

Este proceso abarca el inicio de la separación meiótica proseguida la liberación del cuerpo polar inicial, cuya conformación genética de cromosomas es haploide, y con disposición para una posterior fertilización, como también un desarrollo embrionario (Yang y Chian, 2017).

Se evidencia un crecimiento de la síntesis de proteínas por parte de la granulosa, estos componentes se unen a otros factores y activan la reanudación de la meiosis, la acción enzimática lleva a las células del cumulus

a iniciar una expansión continua. Todos estos cambios conllevan a la producción de un ovocito con capacidad de liberar un ovocito haploide en el estadio de metafase II, y con ello tener la capacidad de posteriores procesos como: maduración, fertilización y desarrollo embrionario (Dumesic et al., 2015).

#### **2.2.8. Ovulación**

Se define como la liberación del ovocito por ruptura del folículo dominante para su posterior fecundación. En otras especies se inicia con la intervención hormonal de la LH y por estímulos externos para lograr una ovulación inducida y con esto lograr la liberación del ovocito. (Fernández, 1971). En especies como los camélidos sudamericanos, se plantea que el plasma seminal tiene alguna incidencia en la liberación del ovocito. (Gigli et al., 2006).

El estradiol sufre variaciones después de la liberación del ovocito, pero disminuye a las 22 horas aproximadamente. (López, 2014). Una vez lograda la cópula, ocurre la ovulación (26-30 horas después) o también se puede inducir con aplicación hormonal, por lo general, se libera un único ovocito, pero hay reportes de liberación múltiples después de realizar monta natural. (Brown, 2000).

### ***2.2.9. Maduración IN VITRO del ovocito***

La maduración in vitro tiene reportes desde el año 1935, con autores como Pincus y Enzmann quienes fueron citados en trabajos anteriores por (De Matos, 1999), notando una meiosis en ovocitos de conejo, esto se vio luego de colocar los ovocitos en medios de cultivo.

La maduración in vitro se plantearía como la remoción de folículos inmaduros para cultivarlos in vitro en medios apropiados que incentiven la maduración hasta metafase II, permitiendo así la adquisición de competencias necesarias para la fecundación y el posterior desarrollo embrionario.

### ***2.2.10. Técnicas de recuperación de los cco***

- **Técnica de aspiración folicular**

Es la técnica más empleada para la recuperación de CCOs. Para ello se utiliza una jeringa con su respectiva aguja con las que por medio de la punción se aspiran los folículos ubicados en la parte externa del ovario (Chuquipaype y Erón, 2015).

- **Técnica de cortes**

Consiste en realizar cortes al ovario para lograr la liberación de líquido folicular, para esto se emplea hojas de bisturí. Según la información revisada,

esta técnica ofrece mejor capacidad de recuperación de CCOs. (Mehmood et al., 2011) (Chuquipaype y Erón, 2015) (Turpo et al., 2015).

#### **2.2.11. Selección de los CCO**

La estructura morfológica de los CCOs es fundamental en la maduración in vitro. Siendo el número de capas del cumulus un factor muy importante al momento de hacer la selección, por eso es de vital importancia seleccionar ovocitos con más de 3 capas para obtener mejores resultados. (Kakkaresy et al., 2010).

El número de capas del cumulus observados al microscopio determina la selección, ello determina la capacidad de maduración del ovocito. (De Loos et al., 1989). La clasificación se da en 4 clases o categorías:

- **Clase 1**

CCOs con células del cumulus superior a 5 capas cuya distribución rodeen por completo el ovocito y con homogeneidad citoplasmática.

- **Clase 2**

CCOs con células del cumulus inferior a 5 capas cuya distribución rodeen completamente el ovocito y con homogeneidad citoplasmática.

- **Clase 3**

CCOs con células del cumulus difusas e incluso sin llegar a formar capas, y citoplasma difuso.

- **Clase 4**

CCOs con citoplasma difuso o incompleto y ausencia de células del cumulus.

Para que la maduración in vitro sea exitosa, se recomienda usar ovocitos de clase 1 y 2, ya que ello asegura un mejor desempeño en el medio de maduración e incrementa la posibilidad de la fertilización in vitro.

#### ***2.2.12. Medios de maduración***

Los medios utilizados en la cultivación para la maduración en laboratorio son variados. Pero comparten similitud en sus componentes como: vitaminas, sales, aminoácidos, glucosa, etc. Entre ellos el que más se usa es el TCM-199 (Chuquipaype y Erón, 2015).

Al mismo tiempo, la adición de sustratos influencia la maduración, existen sustratos que mejoran la maduración como proteínas, fluidos biológicos y hormonas, otros como las gonadotropinas logran un incremento

en la tasa de maduración. (Kim et al., 2008). Es por ello la importancia de aditivos del medio de maduración, esto podría determinar la influencia de las tecnologías reproductivas, es por ello que la maduración incompleta guarda relación con las tasas de éxito tanto en maduración como en producción de embriones, entendiendo la importancia del medio de cultivo al momento de aspirar a una maduración nuclear eficiente (Oberlender et al., 2013).

#### ***2.2.13. Suplementos del medio de maduración***

- **Antibióticos**

Los diferentes medios de maduración usan antibióticos en su composición, esto para evitar contaminaciones por agentes biológicos en las diferentes etapas de la maduración in vitro, los antibióticos más usados son: gentamicina, penicilina y kanamicina (Chuquipaype y Erón, 2015).

- **Proteínas**

Para una fuente eficiente de nitrógeno, se emplean las proteínas, el medio de cultivo obtiene un factor antioxidante al añadir proteínas en su composición (Jee et al., 2008). Entre los más usados se encuentran la albumina sérica bovina y el suero fetal bovino.

La tasa de blastosistos incrementan al usar estos fluidos, ya que funcionan como puentes en la membrana celular, activan la meiosis y promueven la expansión de células del cumulus (Chuquipaype y Erón, 2015).

- **Hormonas**

En la maduración natural, la LH y la FSH desempeñan un rol importante, es por ello que también lo emplean como suplemento en la maduración in vitro. Las gonadotropinas inducen a un crecimiento celular de la granulosa lo cual madura al ovocito. Y para mejorar la maduración se emplea la LH, al mismo tiempo inducen a la meiosis. Para mantener la forma el ovocito, se emplea la FSH, la cual también actúa sobre las células de la granulosa, incentivando su multiplicación (Araújo et al., 2014).

- **Factores de crecimiento**

Los factores de crecimiento actúan principalmente sobre las células del cumulus, promoviendo su multiplicación y su expansión, esto se observó en estudios realizados en roedores (Daen et al., 1994).

- **Agentes antioxidantes**

El elevado porcentaje de especies reactivas al oxígeno (ROS), es la principal diferencia entre una maduración natural y una maduración artificial o en vitro. (Zhao et al., 2018). En la maduración artificial esto se debe a exposiciones del material a la luz y por concentraciones altas de algunos compuestos como: oxígeno, metabolitos y sustratos; por ello se da el uso de antioxidantes en los medios de maduración, lo cual se refleja en los reportes. Existe una gama de antioxidantes disponibles, y los más usados son: vitamina E, vitamina C y melatonina (Dalvit et al., 2005) (Zhao et al., 2018).

#### ***2.2.14. Condiciones para la maduración IN VITRO***

Un experimento con éxito procedimental necesita con relevancia de buenas condiciones de maduración, es por ello que, los controles de algunos parámetros deben hacerse de manera rigurosa, evitando cualquier alteración, para así, asegurar una maduración in vitro deseada (Jee et al, 2008).

- **Temperatura**

Un adecuado manejo de temperatura es crucial para el desarrollo ovocitario, tanto en la maduración y otro proceso, es porque se emplea un parámetro de 38,5 °C en todas las metodologías y este debe mantenerse a lo

largo del espacio temporal empleado en el proceso. (Chuquipaype y Erón, 2015). En otra medida, en camélidos como llamas y alpacas, se utilizaron una temperatura de cultivo diferente, siendo esta de 39° C (Ratto et al., 2005) (Arriaga et al., 2014) obteniendo porcentajes de ovocitos madurados equiparables a los experimentos cuya temperatura empleada en cultivo fueron de 38,5 °C (Leisinger et al., 2014) (Chuquipaype y Erón, 2015).

- **Mezcla de gases**

En los procedimientos que involucran embriones se emplean medios gaseosos y entre ellos existen 2 tipos principales: el primero CO<sub>2</sub> 5 % y 95 % de aire y el segundo CO<sub>2</sub> 5 %, O<sub>2</sub> 5 % y 90% de N<sub>2</sub>. Los cuales se utilizan dependiendo al alcance de oxígeno en las especies, se debe controlar las cantidades de oxígeno para evitar la formación o proliferación de especies reactivas de oxígeno (Chuquipaype y Erón, 2015).

- **pH**

Para realizar un buen cultivo, debemos ajustar el PH a un valor parecido al del plasma sanguíneo, es decir 7,4. es por ello que se emplean compuestos como el bicarbonato de sodio para regular la acidez o la alcalinidad en el medio

de cultivo, de igual manera, se emplea un indicador de PH como el rojo fenol. (Chuquipaype y Erón, 2015).

- **Tiempo de cultivo**

Para la realización de cultivos, el tiempo puede ser variable, y más cuando se trabaja con distintas especies, ya que los requerimientos son diferentes entre una especie y otra. Para los porcinos, el tiempo de cultivo empleado es de 42 a 48 horas (Fernández et al., 2012).

#### ***2.2.15. Componentes del fluido folicular***

Las células de la granulosa y teca más el plasma sanguíneo producen el fluido folicular. Todo esto ocurre por transferencia de componentes mediante la barrera sanguíneo-folicular. (Bijttebier et al., 2008) (Ducolomb et al., 2013). Resultando una combinación de moléculas como: esteroides, electrolitos, proteínas, hormonas, nutrientes y factores de crecimiento. (Klumpp, 2004) (Gilbert, 2005) (Germoush et al., 2018). La composición de fluido folicular es igual en todas las especies, y sus funciones varían fisiológicamente por el ciclo menstrual y el ciclo estral; entre las funciones principales tenemos: ausencia de división meiótica en la célula ovocitaria, crecimiento de las células que

conforman el cumulo, crecimiento del cuerpo lúteo, nutrición del ovocito, etc. (Klumpp, 2004) (Jee et al., 2008) (Ducolomb et al., 2013).

Los reportes en cuanto a los porcinos son prometedoras, el uso de fluido folicular en el medio de maduración beneficia la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario. Así mismo, la combinación entre fluido folicular y FSH incrementa la expansión celular del cúmulo y así mejora la metafase II. De igual forma, existen reportes con resultados negativos por el uso de fluido folicular en solitario. Esto podría deberse al origen del fluido folicular usado (Algriany et al., 2004).

- **Componentes inorgánicos**

Los reportes de componentes inorgánicos en el fluido folicular varían en concentraciones y principalmente son el sodio y el potasio, y en menor cantidad el magnesio, zinc, cobre, cloruros y fosfatos (Klumpp, 2004).

- **Carbohidratos**

Tenemos a la glucosa y la fructosa como carbohidratos principales, siendo la glucosa el de mayor concentración con un 75% y la fructosa en menor porcentaje (Klumpp, 2004).

- **Lípidos y vitaminas**

El fluido folicular también contiene lípidos y vitaminas en su composición, entre ellos tenemos: colesterol, vitamina C y vitamina A (Klumpp, 2004).

- **Proteínas**

El fluido folicular presenta el mismo porcentaje de proteínas que el plasma sanguíneo, lo que si se diferencia es la concentración de las mismas que varían entre 75 % y 50 % (Klumpp, 2004).

- **Enzimas**

El fluido folicular contiene enzimas en su composición, las cuales varían en concentración de acuerdo al desarrollo folicular. La función principal de las enzimas es la ovulación y son las siguientes: lactato deshidrogenasa, transaminasas, fosfatasas, hialuronidasa, endopeptidasa y colagenasa (Klumpp, 2004).

- **Gonadotropinas y esteroides**

Principalmente tenemos a la LH y FSH, ambas ayudan en el desarrollo de la teca en el desarrollo folicular. De la misma forma, las hormonas también forman parte del proceso entre ellas tenemos: estrógenos, andrógenos y progestágenos (Klumpp, 2004). Las hormonas presentes en el fluido folicular

varían según los procesos fisiológicos en desarrollo, el ciclo reproductivo es uno de ellos, como también la especie animal influye en su variación y el tamaño de folículo de la misma forma (Klumpp, 2004).

#### ***2.2.16. Componentes del suero fetal bovino***

Uno de los suplementos de mayor uso en cultivos en vitro es el suero fetal bovino, ya que proporciona una gran cantidad de nutrientes al medio de cultivo, como también antioxidantes (Catt, 1994), al mismo tiempo proporciona factores de crecimiento y componentes hormonales que ayudan al desarrollo embrionario proporcionando un ambiente necesario (Gardner, 1994). Existen otras opciones como la albumina sérica bovina (Gordon, 2003).

La suplementación de le medio de cultivo, ya sea con suero fetal bovino o albumina sérica bovina, favorecen al ovocito ayudando en la formación de blastocito en el proceso (Gordon, 2003).

### 2.3. Conceptos básicos

**CCO.** Conjunto celular ubicadas alrededor del ovocito, que comprende funciones en el mismo folículo y después de la ovulación (Shirazi et al, 2005).

**Fluido folicular.** Es el resultado producido por las células de la granulosa y teca más el plasma sanguíneo. Todo esto ocurre por transferencia de componentes mediante la barrera sanguíneo-folicular (Bijttebier et al., 2008) (Ducolomb et al., 2013).

**Maduración *in vitro*.** Es el proceso en el cual el ovocito sufre cambios estructurales en núcleo y citoplasma que les proporcionan una capacidad competente frente a procesos como la fertilización (Dalton et al., 2013).

**Ovogénesis.** Comprende fases de desarrollo del ovocito como la diferenciación, el crecimiento, y la maduración, todo esto para preparar al ovocito para la fertilización y para el desarrollo embrionario. (Gilbert, 2005).

**Suero fetal bovino.** Se refiere a uno de los suplementos de mayor uso en cultivos *in vitro*, ya que proporciona una gran cantidad de nutrientes al medio de cultivo, como también antioxidantes (Catt, 1994).

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Materiales**

##### ***3.1.1. Ubicación geográfica y temporal***

El trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal ubicado en la sede “los pichones” de la UNJBG, FCAG, situado en las coordenadas latitud 17°59′38″ y latitud 70°14′22″, aproximadamente a 550 ms.n.m. Tacna; en una temperatura que varía entre 22 a 30° (verano) y 10 a 24° (invierno). La obtención de muestras ováricas de porcinos se realizó en el Camal Municipal de Tacna ubicada en Calana.

##### ***3.1.2. Población y muestra***

###### **Población**

Los registros de animales beneficiados en el camal municipal de Tacna “Mario Reynoso Eyzaguirre Yañez” indica una media de 700 animales sacrificados por semana, dando un total de 2 800 animales sacrificados por mes, de los cuales un 50 % son hembras. Un total aproximado de 1 400 marranas de diferentes edades y números de partos (gorrinas y marranas).

La toma de muestras se realizó 1 vez por semana, tomándose una media por día de 100 animales, y 4 días en un mes fueron 400 animales, de los cuales el 50 % son hembras

Entonces nuestra población fue de 200 marranas

### **Muestra**

El muestreo fue tipo probabilístico para poblaciones finitas ( $N=1\ 320$ ). Se consideraron cuatro tratamientos, con un tamaño del efecto esperado de 0,4, que corresponde a una diferencia moderada entre medias.

Se determinó mediante la fórmula:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot \sigma^2}{(N - 1) \cdot E^2 \cdot Z^2 \cdot \sigma^2}$$

Donde:

$N$  = tamaño de la población

$Z_{\alpha/2}$  = valor de  $Z$  con  $\alpha$

$\sigma$  = Desviación estándar

$E$  = Error máximo permisible

El valor  $Z_{\alpha/2}$  se obtuvo de la tabla siendo  $Z_{0.05/2}$  igual a 1,96, según (Araújo, et al., 2014) sugiere que el valor de  $\sigma = 0,25$  y  $E = 0,05$ , estos valores se reemplazaron en la fórmula:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot \sigma^2}{(N - 1) \cdot E^2 \cdot Z^2 \cdot \sigma^2} \quad n = \frac{200 \cdot (1.96)^2 \cdot (0.25)^2}{(200 - 1) \cdot (0.05)^2 \cdot (1.96)^2 \cdot (0.25)^2}$$

$$n = 65.10 = 66, \text{ redondeando al inmediato superior}$$

Se utilizó 66 animales en total, 22 animales por tratamiento como mínimo.

### 3.1.3. Materiales

- |                       |                      |               |
|-----------------------|----------------------|---------------|
| - Jeringas            | - Agua ultra pura    | - PBS         |
| - Agujas              | - NaOH               | - BSA         |
| - placas petri        | - Hcg                | - SFB         |
| - tips de 10 ul       | - Ecg                | - Antibiótico |
| - tips de 100 ul      | - filtros 0.22um     | - tubos 1ml   |
| - tips de 200 ul      | - bisbenzimida       | - microscopio |
| - placa de 4 pocillos | - ioduro de propidio | - incubadora  |

## 3.2. Método

### 3.2.1. Tipo y diseño de la investigación

**Experimental.** Durante la duración del experimento se manipularon de manera voluntaria y coherente todas las variables y se observaron los resultados dentro de un ambiente controlado.

### 3.2.2. Diseño procedimental

El Suero fetal bovino y fluido folicular se adicionaron según tratamiento:

**T1:** el tratamiento número 1 fue a base del medio de maduración más la adición de alcohol polivinílico para la maduración de los ovocitos: TCM+ alcohol polivinílico (PVA) al 0,1% (control)

**T2:** el tratamiento número 2 fue a base del medio de maduración más la adición del suero fetal bovino: TCM+10% de Suero fetal bovino

**T3:** el tratamiento número 3 fue a base del medio de maduración más la adición de líquido folicular o fluido folicular: TCM+10% de Liquido Folicular

**Tabla 1**

*Diseño procedimental*

| TRATAMIENTOS                 | T1 (control)               | T2                 | T3                 |
|------------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| Medios y complementos        | TCM+ PVA al 0,1% (control) | TCM+10% SFB        | TCM+10% de FF      |
| Cantidades                   | 5 ± 1                      | 5 ± 1              | 5 ± 1              |
| Repeticiones por tratamiento | 1 veces por semana         | 1 veces por semana | 1 veces por semana |
| Total                        | 22                         | 22                 | 22                 |

### **Recuperación de COCs de ovarios**

Los ovarios fueron diseccionados del aparato reproductor y se colocaron en un termo con solución fisiológica temperada 25°C a 30°C y se transportaron al laboratorio para lavarlos con solución fisiológica a temperatura 37°C. la recuperación de los COCs se realizó por punción utilizando jeringas con capacidad de 10ml y su respectiva aguja N° 21, los folículos considerados tuvieron que medir entre los 3 a 5mm. Donde, los COCs obtenidos fueron clasificados según su aspecto del citoplasma y las células que los rodean.

### **Recuperación del fluido folicular**

El FF porcino se obtuvo por aspiración directa del contenido folicular de folículos superiores a 3mm de tamaño procedentes de hembras adultas, el contenido folicular aspirado se centrifugó a 1 500g durante 30 min a 5°C. Finalmente el sobrenadante se pasó por un material filtrante de 0,22  $\mu$ m. Se colocó en envases tubulares de 1 ml y fue almacenado a -20°C hasta su uso.

### **Maduración in vitro**

Los COCs seleccionados fueron inducidos a MIV en el medio de cultivo a base de TCM-199 suplementado con cysteina 0,57mM, 10 UI eCG, 10 UI

hCG y antibiótico. El Suero fetal bovino y líquido folicular se adicionó según tratamiento:

T1: TCM+ alcohol polivinílico (PVA) al 0,1 % (control)

T2: TCM+10 % de Suero fetal bovino

T3: TCM+10 % de fluido folicular

Por un periodo de 46 horas en una incubadora bajo condiciones de 5% de CO<sub>2</sub>, T° 39,0 y 99 % de humedad.

### **Tinción de Ovocitos**

Para evaluar el estado meiótico de los ovocitos después de la MIV, los ovocitos fueron desnudados, y colocados en 1ug/ml (Hoechst 33342; Sigma-Aldrich) en PBS durante 30 min a condición ambiental normal, se lavaron en PBS y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se clasificaron según su configuración de cromatina en VG, MI, MII y degenerado.

### **Instrumento de medición**

Los ovocitos madurados por 46 horas fueron fijados y teñidos con Hoechst (33342) y observados en un microscopio de fluorescencia. Donde se clasificaron según su configuración de su cromatina. Según tratamiento.

### **Metodología de recolección de datos**

Todos los datos, tanto de campo como de laboratorio fueron recolectados en fichas de registro según corresponda.

#### **3.2.3. Análisis de datos**

Para realizar la evaluación del efecto producido por los suplementos FF y SFB sobre la maduración in vitro de ovocitos porcinos; los resultados obtenidos fueron comparados con el grupo control, los resultados obtenidos se expresaron en valores porcentuales y la visualización se dió en figuras; el estadístico inferencial se realizó en el software estadístico IBM SPSS statistics. La normalidad de los datos fue verificada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de los tratamientos sobre la tasa de maduración ovocitaria. En todas las pruebas se consideró un nivel de significancia del 95 % ( $p < 0,05$ ).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1. Presentación de resultados

Se aspiraron un total de 1 003 folículos provenientes de 132 ovarios, a partir de los cuales se lograron recuperar 708 complejos cúmulo–ovocito (COCs).

**Tabla 2**

*Resultados de recuperación de cocs*

| ovarios | Folículos aspirados | COCs recuperados | Tasa de recuperación (%) | Categoría (%) |       | COCs |
|---------|---------------------|------------------|--------------------------|---------------|-------|------|
|         |                     |                  |                          | A             | B     | C    |
| 132     | 1 003               | 708              | 70,59                    | 11,02         | 82,49 | 6,49 |

*Nota: COCs: complejos cumulus-ovocitus; A, B y C: calidad de ovocitos*

De los 708 ovocitos recuperados, llegaron a la tinción 535 ovocitos (75,56 %); obteniendo una pérdida de 173 ovocitos en el proceso de maduración (24,44 %); ello debido a muchos factores en el proceso como: morfología del complejo cumulo- ovocito, diámetro folicular , morfología del primer corpúsculo polar , factores genéticos, composición del medio, osmolaridad del medio, estrés oxidativo, duración del cultivo, método de recuperación del ovocito,

condiciones del almacenamiento de los ovarios, procedimientos de denudación, etc.

#### 4.1.1. Comparar el efecto de la adición de fluido folicular y el suero fetal bovino al medio de maduración in vitro de ovocitos de porcinos

**Tabla 3**

*Resultados de estadíos de maduración in vitro de los grupos FF, SFB y control, expresados en porcentajes (%)*

| <b>Estadíos de la<br/>Maduración Nuclear</b> | <b>Control<br/>(%)</b> | <b>FF<br/>(%)</b> | <b>SFB<br/>(%)</b> |
|----------------------------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| <b>n</b>                                     | <b>174</b>             | <b>170</b>        | <b>191</b>         |
| <b>Degenerado</b>                            | 11,49                  | 20                | 18,85              |
| <b>Vesícula Germinal</b>                     | 37,36                  | 25,3              | 30,37              |
| <b>Metafase I</b>                            | 31,61                  | 24,7              | 20,41              |
| <b>Metafase II</b>                           | 19,54                  | 30                | 30,37              |
| <b>TOTAL</b>                                 | 100                    | 100               | 100                |

*Nota: FF: fluido folicular; SFB: suero fetal bovino*

Los resultados de maduración nuclear in vitro de ovocitos porcinos por efecto del fluido folicular y suero fetal bovino frente al grupo control se muestran en la **Tabla 3** en el cual se interpreta que:

En el grupo control (TCM+ alcohol polivinílico (PVA) al 0,1 %) se leyó 174 ovocitos de los cuales 37,36 % se observaron en la fase de vesícula germinal, 31,61 % en metafase I, en metafase II se observó un 19,54 % y 11,49 % se degeneraron. En el caso del tratamiento con adición de fluido folicular en el medio de maduración (TCM+10 % de Líquido Folicular) se leyeron 170 ovocitos de los cuales un 25,3 % llegaron a vesícula germinal, 24,7 % a metafase I, 30,00 % a metafase II y el 20 % se degeneraron. Respecto al tratamiento con adición de suero fetal bovino en el medio de maduración (TCM+10 % de suero fetal bovino) un 30,37 % lograron llegar a vesícula germinal, 20,41 % a metafase I, 30,37 % a metafase II y el 18,85 % se degeneraron. El porcentaje de ovocitos que se encontraron en el estadio de vesícula germinal fue mayor en el grupo control con un 37,36 %, notándose que el alcohol polivinílico al 0,1 % promueve esta etapa. En metafase I el porcentaje de ovocitos fue mayor en el grupo control con un 31,61 %, de igual manera el alcohol polivinílico al 0,1 % promueve esta la maduración en este estadio. En Metafase II el grupo con la adición de suero fetal bovino obtuvo mejores resultados, con un 30,37 %, esto se debe a la buena acción antioxidante del suero fetal bovino que al mismo tiempo disminuye el estrés oxidativo en los ovocitos. Por otro lado, los ovocitos que terminaron

degenerándose en el grupo de fluido folicular fue de 20 %, siendo este el más alto, lo cual podría deberse al proceso de obtención del fluido folicular, ya que varios factores influyen en su obtención. Al análisis estadístico determinado por el porcentaje de maduración nuclear in vitro de ovocitos porcinos, No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ni entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ); sin embargo, se observó un mayor porcentaje de maduración hasta la metafase II en los tratamientos suplementados con fluido folicular (FF) y suero fetal bovino (SFB).

#### 4.1.2. Efecto del suplemento fluido folicular sobre la maduración in vitro de ovocitos porcinos

**Tabla 4**

*Resultados de estadíos de maduración in vitro del fluido folicular y grupo control expresados en porcentajes (%)*

| <b>Tratamiento</b>       | <b>Control</b> | <b>Fluido Folicular</b> |
|--------------------------|----------------|-------------------------|
| <b>Estadíos</b>          | <b>(%)</b>     | <b>(%)</b>              |
| <b>n</b>                 | 174            | 170                     |
| <b>Degenerado</b>        | 11,49          | 20,00                   |
| <b>Vesícula Germinal</b> | 37,36          | 25,30                   |
| <b>Metafase I</b>        | 31,61          | 24,70                   |
| <b>Metafase II</b>       | 19,54          | 30,00                   |
| <b>TOTAL</b>             | 100            | 100                     |

Los resultados de la maduración in vitro de ovocitos porcinos por efecto del fluido folicular frente a grupo control se muestran en la **Tabla 4** en el cual se interpreta que:

El porcentaje de ovocitos que se encontraron en el estadio de vesícula germinal fue menor en el tratamiento con la adición de fluido folicular al medio de maduración obteniendo un 25,30 % en comparación con el tratamiento control 37,36 %. En metafase I hay una regresión notable en el tratamiento con la adición del fluido folicular al medio de maduración, dando un porcentaje de 24,70 % mientras que el tratamiento control obtuvo 31,61 %, sugiriendo que el fluido folicular no promueve la maduración nuclear en esta etapa. En Metafase II, en el grupo control el 19,54 % alcanzó este estadio, mientras que el tratamiento con la adición de fluido folicular al medio de maduración fue de 30,00 % lo que nos demuestra que el fluido folicular promueve la maduración en esta etapa debido a su alta carga hormonal que influye en la maduración nuclear. Por otro lado, los ovocitos que terminaron degenerándose en el grupo control fue de 11,49 % y en el tratamiento con adición de fluido folicular al medio de maduración el porcentaje fue de 20,00 %, lo que demuestra que la adición de fluido folicular promueve la degeneración, lo cual puede deberse a factores referidos a la obtención y procesamiento del fluido folicular, ya que

estos procesos son cruciales para obtener un fluido folicular de buena calidad. Si bien el fluido folicular posee cualidades altamente superiores al grupo control, al análisis estadístico, estos resultados no mostraron diferencias entre tratamientos en los diferentes estadios de maduración nuclear ( $P>0,05$ ) es decir no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguna de los estadios. Los resultados podrían ser consecuencia de la alta carga hormonal que posee el fluido folicular y la variación de las mismas podrían ser efecto de la fisiología folicular de donde se obtuvo el suplemento, ya que factores como los procesos fisiológicos en desarrollo, el ciclo reproductivo, la edad del animal y el tamaño del folículo influye en la variación hormonal del suplemento.

#### 4.1.3. Efecto del suplemento suero fetal bovino sobre la maduración in vitro de ovocitos porcinos

**Tabla 5**

*Resultados de estadíos de maduración in vitro del suero fetal bovino y el grupo control, expresados en porcentajes (%)*

| <b>Tratamiento</b>       | <b>Control</b> | <b>Suero Fetal Bovino</b> |
|--------------------------|----------------|---------------------------|
| <b>Estadíos</b>          | <b>(%)</b>     | <b>(%)</b>                |
| <b>n</b>                 | 174            | 191                       |
| <b>Degenerado</b>        | 11,49          | 18,85                     |
| <b>Vesícula Germinal</b> | 37,36          | 30,37                     |
| <b>Metafase I</b>        | 31,61          | 20,41                     |
| <b>Metafase II</b>       | 19,54          | 30,37                     |
| <b>TOTAL</b>             | 100            | 100                       |

Los resultados de maduración in vitro de ovocitos porcinos por efecto de la adición de suero fetal bovino al medio de maduración frente al tratamiento control se muestran en la **Tabla 5**, donde se interpreta que:

En el estadio de Vesícula germinal el grupo control obtuvo el 37,36 % de los ovocitos y con suero fetal bovino este resultado disminuyó a 30,37 %, lo que sugiere que el suero fetal bovino no promueve la maduración de ovocitos en esta fase de la maduración nuclear. Caso similar sucede en Metafase I ya que el tratamiento control alcanza el 31,61 % de ovocitos sin

embargo el tratamiento con adición de suero fetal bovino al medio de maduración disminuye este porcentaje significativamente a 20,41 %, lo que indica que el suero fetal bovino tiene un efecto negativo frente al grupo control en este estadio de maduración. Por otro lado, en el estadio de Metafase II el tratamiento control obtiene 19,54 % de ovocitos que alcanzan este estadio y en el tratamiento con adición de suero fetal bovino al medio de maduración el porcentaje aumenta a 30,37 % lo que sugiere que la adición de suero fetal bovino tiene un efecto positivo en la maduración completa de los ovocitos porcinos. En el caso de la degeneración el tratamiento control obtuvo un 11,49 % de ovocitos degenerados, y el tratamiento con adición de suero fetal bovino al medio de maduración aumenta a 18,85 % indicando que el suero fetal bovino incrementa la degeneración. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas según la prueba ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ), los presentes resultados sugieren que el suero fetal bovino tiene una tendencia a disminuir el porcentaje vesícula germinal, de igual manera en Metafase I, pero incrementa el porcentaje significativamente en Metafase II e incrementa el porcentaje de ovocitos degenerados. Estos hallazgos podrían atribuirse al efecto del suero fetal bovino, el cual es conocido por poseer propiedades antioxidantes las cuales protegen a las células contra el estrés oxidativo y favorecer el desarrollo

celular gracias a los factores de crecimiento que posee y a los componentes hormonales en su estructura. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para confirmar estos resultados.

#### 4.1.4. Contrastación de hipótesis

**Tabla 6**

*Prueba de normalidad para el número de ovocitos en cada estadio de maduración*

|                   | Shapiro-Wilk |    |       |
|-------------------|--------------|----|-------|
|                   | Estadístico  | gl | Sig.  |
| Degenerado        | 0,926        | 15 | 0,241 |
| Vesícula germinal | 0,925        | 15 | 0,232 |
| Metafase I        | 0,980        | 15 | 0,969 |
| Metafase II       | 0,853        | 15 | 0,941 |

De acuerdo a los resultados de la **tabla 6** donde se presenta la prueba de normalidad de Shapiro – Wilk, esta prueba se utiliza cuando la muestra es pequeña y es requisito previo para la prueba ANOVA, los valores de significancia obtenidos para los estadios de maduración nuclear degenerado, vesícula germinal, metafase I y metafase II fueron mayores a 0,05, lo que indica que los datos se distribuyen de manera normal; en consecuencia, se

cumple el supuesto de normalidad requerido para aplicar pruebas paramétricas, permitiendo utilizar el análisis de varianza (ANOVA) para comparar el efecto de los tratamientos sobre la maduración nuclear de los ovocitos porcinos.

### **Hipótesis general**

Hi: La adición de suplementos como fluido folicular y suero fetal bovino si tiene efectos significativos sobre la maduración in vitro de ovocitos de porcinos.

Ho: La adición de suplementos como fluido folicular y suero fetal bovino no tiene efectos significativos sobre la maduración in vitro de ovocitos de porcinos.

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

Prueba estadística: ANOVA

Decisión:

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

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

**Tabla 7**

*Prueba de anova entre los tratamientos y el grupo de control en cada estadio de maduración*

|                      |                     | Suma de<br>cuadrados | gl | Media<br>cuadrática | F     | Sig.  |
|----------------------|---------------------|----------------------|----|---------------------|-------|-------|
| Degenerado           | Entre grupos        | 30,40                | 2  | 15,20               | 0,761 | 0,488 |
|                      | Dentro de<br>grupos | 239,60               | 12 | 19,96               |       |       |
|                      | Total               | 270,00               | 14 |                     |       |       |
| Vesícula<br>germinal | Entre grupos        | 50,53                | 2  | 25,26               | 0,860 | 0,448 |
|                      | Dentro de<br>grupos | 352,40               | 12 | 29,36               |       |       |
|                      | Total               | 402,93               | 14 |                     |       |       |
| Metafase I           | Entre grupos        | 28,93                | 2  | 14,46               | 0,395 | 0,682 |
|                      | Dentro de<br>grupos | 440,00               | 12 | 36,66               |       |       |
|                      | Total               | 468,93               | 14 |                     |       |       |
| Metafase II          | Entre grupos        | 60,93                | 2  | 30,46               | 0,443 | 0,652 |
|                      | Dentro de<br>grupos | 824,80               | 12 | 68,73               |       |       |
|                      | Total               | 885,73               | 14 |                     |       |       |

Según los resultados obtenidos de la prueba de ANOVA en la **tabla 7**, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre el

grupo control y los tratamientos suplementados con fluido folicular y suero fetal bovino en ninguno de los estadios de maduración nuclear evaluados (degenerado, vesícula germinal, metafase I y metafase II); indicando que, aunque se observaron variaciones numéricas entre los grupos, dichas diferencias no fueron suficientes para considerarse significativas desde el punto de vista estadístico; por lo tanto, bajo las condiciones del presente estudio, tanto el fluido folicular como el suero fetal bovino mostraron un comportamiento similar al del control en cuanto al número de ovocitos que alcanzaron los distintos estadios de maduración nuclear, sugiriendo que ninguno de los tratamientos ejerció un efecto diferencial marcado sobre el proceso de maduración nuclear in vitro de los ovocitos porcinos.

**Tabla 8**

*Prueba de Dunnett entre los tratamientos y el grupo de control en cada estadio de maduración*

| Variable dependiente      | (I) Tratamientos   | (J) Tratamientos | Diferencia de medias (I-J) | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|---------------------------|--------------------|------------------|----------------------------|------|-------------------------------|-----------------|
|                           |                    |                  |                            |      | Límite inferior               | Límite superior |
| Estadío degenerado        | Fluido folicular   | Control          | 2,80                       | ,527 | -4,27                         | 9,87            |
|                           | Suero fetal bovino | Control          | 3,20                       | ,443 | -3,87                         | 10,27           |
| Estadío vesícula germinal | Fluido folicular   | Control          | -4,40                      | ,363 | -12,98                        | 4,18            |
|                           | Suero fetal bovino | Control          | -1,40                      | ,887 | -9,98                         | 7,18            |
| Estadío metafase I        | Fluido folicular   | Control          | -2,60                      | ,727 | -12,18                        | 6,98            |
|                           | Suero fetal bovino | Control          | -3,20                      | ,625 | -12,78                        | 6,38            |
| Estadío metafase II       | Fluido folicular   | Control          | 3,40                       | ,747 | -9,72                         | 16,52           |
|                           | Suero fetal bovino | Control          | 4,80                       | ,574 | -8,32                         | 17,92           |

De acuerdo con la prueba de Dunnett presentada en la **tabla 8**, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos con fluido folicular y suero fetal bovino respecto al grupo control en ninguno de los estadios de maduración nuclear evaluados. Aunque ambos tratamientos mostraron valores medios ligeramente superiores en el porcentaje de ovocitos en Metafase II, las diferencias no alcanzaron significancia estadística; sugiriendo que, el efecto de los suplementos sobre la maduración nuclear fue similar al del medio control. La prueba de Dunnett, determina que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos experimentales y el grupo control en ninguno de los estadios de maduración nuclear; por lo tanto, si bien se observaron ligeras variaciones numéricas entre grupos, estas no fueron suficientes para considerarse relevantes desde el punto de vista estadístico. En consecuencia, se rechaza la hipótesis de la investigación ( $H_1$ ) y se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ), indicando que los suplementos evaluados no produjeron un efecto significativo sobre la maduración nuclear de los ovocitos porcinos.

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN**

La maduración in vitro (MIV) de ovocitos porcinos, es un proceso complejo que depende de múltiples factores, entre ellos los factores de crecimiento. En este contexto, los suplementos como fluido folicular y suero fetal bovino 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.

#### **5.1. Efecto del suplemento fluido folicular y suero fetal bovino sobre la maduración in vitro de ovocitos porcinos**

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian que tanto la adición de fluido folicular (FF) y suero fetal bovino (SFB) al medio de maduración in vitro de ovocitos porcinos influyen positivamente en la progresión de los ovocitos en el estadio de metafase II (ovocitos maduros) con 30,00 % para el fluido folicular y 30,37 % para el suero fetal bovino en comparación con el 19,54 % del grupo control. En la comparación entre ambos suplementos, los resultados sugieren que el fluido folicular proporciona un ambiente más fisiológico, al imitar las condiciones naturales del folículo,

mientras que el suero fetal bovino actúa como complemento genérico. Sin embargo, el fluido folicular puede variar en su composición según el estadio folicular de los folículos de los cuales se extrae y la fuente de la misma, lo que implica la necesidad de estandarizar su obtención y concentración para garantizar una calidad adecuada. existen investigaciones realizados con dichos suplementos en diferentes concentraciones y en otras especies, los cuales usaremos como punto de referencia.

Restrepo et al. (2011) obtuvieron resultados muy diferenciados entre el suero fetal bovino y el fluido folicular, evaluaron la maduración in vitro de oocitos equinos suplementando el medio de maduración con fluido folicular y suero fetal bovino, obteniendo un 16,20 % para el FF, y el porcentaje de maduración en nuestro experimento es de 30 %. En cuanto al suero fetal obtuvieron un 47,50 % de ovocitos maduros, y nuestro estudio alcanzo un 30,37 % de maduración de ovocitos en metafase II. Notándose una variación significativa entre ambos suplementos.

De igual manera, Castro (2018) obtuvo resultados similares a los nuestros, evaluó el efecto del fluido folicular de alpaca en la maduración ovocitaria in vitro de ovocitos de alpaca, obteniendo un 24,70 % adicionando

FF y un 25,00 % con SFB, dichos resultados son muy similares a los nuestros: 30,00 % para FF y 30,37 % para SFB, notandode similitud entre los resultados. Estas similitudes y variaciones pueden deberse a la especie de estudio, el porcentaje de concentración de los suplementos y a la composición de los mismos, los cuales proveen moléculas necesarias para favorecer la maduración de los ovocitos. En el caso del fluido folicular posee esteroides, electrolitos, proteínas, hormonas, nutrientes y factores de crecimiento (Gilbert, 2005) los cuales favorecen la maduración nuclear; por otro lado, el suero fetal bovino proporciona una gran cantidad de nutrientes, antioxidantes, factores de crecimiento y hormonas (Gordon, 2003).

En conclusión, el fluido folicular demuestra un efecto positivo y más fisiológico en la maduración in vitro de ovocitos porcinos (Klumpp, 2004) en comparación con el suero fetal bovino, aunque la variabilidad biológica del fluido folicular exige un control más riguroso de sus características. Muestra de ello es nuestra investigación donde la adición de suero fetal bovino obtuvo mejores resultados que la adición de fluido folicular, esto pudo deberse a la variabilidad biológica de la muestra obtenida.

## **5.2. Efecto del suplemento fluido folicular sobre la maduración in vitro de ovocitos porcinos**

Los resultados indican que la adición de fluido folicular en el medio de maduración in vitro de ovocitos porcinos tuvo un efecto positivo en la progresión de los ovocitos hacia el estadio de metafase II (ovocitos maduros) con 30,00 % en comparación con el 19,54 % del tratamiento control.

Nuestros resultados coinciden con investigaciones previas que indican que el fluido folicular proporciona un entorno más fisiológico y similar al folículo ovárico, lo cual mejora la calidad y competencia de los ovocitos, como lo reportado por (Limache, 2015) quien consiguió un 54,19 % de maduración de ovocitos bovinos adicionando fluido folicular al medio de maduración, los COCs fueron incubados durante 24 h a 38,5 °C a una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> y humedad saturada en una incubadora. Esta diferencia de 24 % podría deberse a la especie en estudio (bovino). De la misma forma, Argudo et al. (2018) reportó un 51,53 % de maduración in vitro de ovocitos de porcinos pre púberes a 38,5°C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas, siendo el resultado superior al de nuestro estudio. El uso de fluido folicular como suplemento natural en la maduración in vitro de ovocitos porcinos podría incrementar la calidad ovocitaria y la tasa de fecundación, mejorando así la eficiencia de las

técnicas de reproducción asistida y producción in vitro de embriones porcinos. Así mismo, la combinación entre fluido folicular y hormona folículo estimulantes incrementa la expansión celular del cumulo y así mejora la metafase II, de igual forma, existen reportes con resultados negativos por el uso de fluido folicular en solitario, esto podría deberse al origen del fluido folicular usado (Algriany et al., 2004) Sin embargo, se requiere de más estudios para definir la composición ideal y las concentraciones optimas que maximicen su efecto benéfico.

### **5.3. Efecto del suplemento suero fetal bovino sobre la maduración in vitro de ovocitos porcinos**

Los resultados indican que la adición de suero fetal bovino en el medio de maduración in vitro de ovocitos porcinos tuvo un efecto positivo en la progresión de los ovocitos hacía el estadio de metafase II (ovocitos maduros) con 30,37 % en comparación con el 19,54 % del grupo control. Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de suero fetal bovino en el medio de maduración estimula la expansión del cúmulo oóforo y la reanudación de la meiosis, permitiendo que una mayor proporción de ovocitos alcance el estadio de metafase II (Gordon, 2003).

Como lo reportado por Restrepo et al. (2007) donde reportó una efectividad del 31,20 % de maduración de ovocitos bovinos, utilizando suero fetal bovino como suplemento al medio de cultivo y maduraron a 38,5°C en un ambiente de 5 % de CO<sub>2</sub> con 100 % humedad durante 24 Horas, siendo esta cifra muy similar a nuestro estudio donde se encontraron resultados de 30,37 % con el mismo medio, esto puede deberse a la especie en estudio o a la composición del medio de cultivo utilizado. De igual manera (Onofre, 2019) en su investigación sobre maduración in vitro de ovocitos de alpaca con el uso de suero fetal bovino como suplemento reportó un 17,11 % de ovocitos madurados en metafase II a 4°C por un tiempo de 24 horas, siendo esta última menor a los resultados obtenidos en el estudio, los factores climatológicos en la delimitación espacial de la investigación de (Onofre, 2019) pueden ser la causa de obtener un bajo porcentaje de maduración, de la misma forma, la especie influye en la maduración, puesto que, los camélidos sudamericanos tienden a sufrir estrés cuando se altera su confort, y se utiliza una temperatura de cultivo diferente, siendo esta de 39°C (Ratto et al., 2005).

El suero fetal bovino contiene proteínas (como albúmina y globulinas), factores de crecimiento (IGF-1, EGF, FGF), hormonas, vitaminas, lípidos, aminoácidos esenciales, minerales, antioxidantes, enzimas y moléculas

transportadoras (Gardner, 1994), que en conjunto crean un ambiente adecuado, nutritivo, protector y regulador para los ovocitos porcinos durante la maduración in vitro. Estos componentes favorecen la expansión del cúmulo, estabilizan la membrana celular, facilitan el transporte de nutrientes, reducen el estrés oxidativo y mejoran la maduración nuclear (Catt, 1994). El suero fetal bovino incrementa la viabilidad ovocitaria, promueve la transición correcta entre fases de maduración (VG - MI - MII).

El suero fetal bovino constituye un componente eficaz y versátil en los medios de maduración in vitro de ovocitos porcinos, especialmente para promover la maduración nuclear y la expansión del cúmulo.

## **CONCLUSIONES**

- 1.** La aplicación de los suplementos fluido folicular y el suero fetal bovino en la maduración in vitro de ovocitos. ambos suplementos aportan componentes favorables que influyen de manera positiva el proceso de maduración ovocitaria.
- 2.** La suplementación del medio de maduración in vitro con fluido folicular aumenta el porcentaje de ovocitos porcinos que alcanzan el estadio de metafase II, lo que sugiere que el suplemento fluido folicular favorece la maduración nuclear.
- 3.** La adición de suero fetal bovino al medio de maduración in vitro favorece positivamente la obtención de ovocitos porcinos en metafase II, evidenciando un resultado positivo del suplemento en el desarrollo ovocitario hasta ovocito maduro.

## **RECOMENDACIONES**

- 1.** Diseñar estudios comparativos respecto al análisis de maduración nuclear, citoplasmática y desarrollo embrionario in vitro, para determinar cuál suplemento entre el fluido folicular y suero fetal bovino y/o combinación maximiza la eficiencia reproductiva en porcinos.
- 2.** Investigar la influencia de la composición hormonal y de los factores biológicos del fluido folicular, considerando variables como ciclo reproductivo, tamaño folicular y edad, evaluar su combinación con hormonas folículo estimulantes o factores de crecimiento como EGF para optimizar la maduración hacia metafase II y la calidad ovocitaria.
- 3.** Explorar los efectos de diferentes concentraciones y fraccionamientos de los componentes del suero fetal bovino, evaluando la relación entre sus componentes hormonales y antioxidantes y la maduración ovocitaria, así como estrategias para minimizar la degeneración de ovocitos durante el proceso de maduración in vitro.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Algriany, O., Bevers, M., Schoevers, E., Colenbrander, B., y Dielman, S. (2004). follicle size - dependent effects of sow follicular fluid on in vitro cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocyte complexes. *theriogenology*.
- Alvariño, J., y Ubilla, E. (2003). Fisiología de la reproducción en la hembra. *Ediciones mundiprensa. España*.
- Araújo, V., Gastal, M., Figueiredo, J., y Gastal, E. (2014). In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive biology and endocrinology*.
- Argudo, D., Borja, D., Wilches, V., y Agurto, V. (2018). adición del fluido folicular en la maduración de ovocitos de cerdas prepúberes. V *Simposio Internacional de Producción Animal*.
- Arriaga, I., Huanca, W., Terreros, M., Becerra, J., García, P., y Ampuero, A. (2014). Efecto de Temperatura y Tiempo de Almacenamiento de Ovarios de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y División in vitro de Ovocitos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*.

- Arthur, G., y Noakes, D. (2003). Reproducción y obstetricia en veterinaria. *Editorial Interamericana. McGraw-hill.*
- Azada, D. (2000). Criopreservación de ovocitos y fertilización in vitro en bovinos. *Primera edición.*
- Bayer, W. (2010). Producción ovina. *Universidad Nacional De Río Cuarto Facultad De Agronomía y Veterinaria. Argentina.*
- Bijttebier, J., Van Soom, A., Mateusen, B., Maes, E., y Maes, D. (2008). Preovulatory follicular fluid during in vitro maturation decreases polyspermic fertilization of cumulusintact porcine oocytes: in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology.*
- Brown, B. (2000). A review on reproduction in South American camelids. *Animal reproduction science.*
- Cabodevila, J., y Teruel, M. (2001). Criopreservación de embriones bovinos. En: Biotecnología de la reproducción. *Argentina: Instituto Nacional de Tecnología INTA.*
- Casillas, F., Ducolomb, Y., Lemus, A., Cuello, C., y Betancourt, M. (2015). Porcine embryo production following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection from vitrified immature oocytes matured with a granulosa cell co-culture system.

- Casillas, F., Teteltitla Silvestre, M., Ducolomb, Y., Lemus, A., Salazar, Z., Casas, E., y Betancourt, M. (2014). Co-culture with granulosa cells improves the in vitro maturation ability of porcine immature oocytes vitrified with cryolock. *Cryobiology*.
- Castro Modesto, T. M. (2018). Efecto del fluido folicular de alpaca en la maduración ovocitaria in vitro de alpaca (*Vicugna pacos*). *repositorio UNMSM*.
- Catt, J. (1994). J. W. (1994). Bovine embryo co-culture. *Cell Biology International*.
- Chuquipaype, M., y Erón, R. (2015). Adaptación de un protocolo de fertilización in vitro para alpacas (*Vicugna pacos*) y su evaluación a 4200 msnm en el departamento de Puno. *Universidad católica de Santa María*.
- Combelles, C. (2013). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology*.
- Cox, N. (1997). Control of follicular development and ovulation rate in pigs. *J Reprod Fertil Supp*.
- Daen, F., Sato, E., Naito, K., y Toyoda, Y. (1994). The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in

porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of reproduction and fertility*.

Dalin, A., Nanda, T., Hultén, F., y Einarsson, S. (1995). Ovarian activity at naturally attained oestrus in the sow. An ultrasonographic and LH study. *Acta Vet Scand*.

Dalton, C., Szabadkai, G., y Carrol, J. (2013). Measurement of ATP in single oocytes: impact of maturation and cumulus cells on levels and consumption. *Journal of celular physiology*.

Dalvit, G., Llanes, S., Descalzo, P., Insani, M., Beconi, M., y Cetica, P. (2005). Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. *Reproduction in Domestic Animals*.

De Loos, F., Van Vliet, C., van Maurik, P., y Kruip, T. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete research*.

De Matos, D. (1999). Producción de embriones de bovinos in vitro: Estimulación de la síntesis de glutatión durante la maduración in vitro de ocitos y su efecto sobre el desarrollo de los embriones. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires*.

- Dias, F., Khan, M., Adams, G., Sirard, M., y Singh, J. (2014). Granulosa cell function and oocyte competence: super-follicles, super-moms and super-stimulation in cattle. *Animal reproduction science*.
- Donglin, O., Hyerin, C., Mirae, K., Lian, C., Joohyeong, L., Ali, J., Sang - Hwan, H. (2023). interleukin - 7 enhances in vitro development and blastocystquality in porcine parthenogenetic embryos. *frontiers in veterinary*.
- Driancourt, M. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*.
- Ducolomb, Y., González Márquez, H., Fierro, R., Jiménez, I., Casas, E., Flores, D., Betancourt, M. (2013). Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization. *Theriogenology*.
- Dumesic, D., Meldrum, D., Katz-Jaffe, M., Krisher, R., y Schoolcraft, W. (2015). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and sterility*.
- Evans, A. (2003). Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod Dom Anim*.

Fernández Baca, S. (1971). La alpaca: reproducción y crianza. *Boletín de divulgación*.

Fernandez, H. (2023). caracterizacion del fluido folicular y oviductal equino: aplicacion a las tecnicas de fecundacion in vitro. *universidad de extremadura*.

Fernández Reyez, F., Ducolomb, Y., Romo, S., Casas, E., Salazar, Z., y Betancourt, M. (2012). Viability, maturation and embryo development in vitro of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology*.

Foxcroft, G., y Hunter, M. (1985). Basic physiology of follicular maturation in the pig. *J Reprod Fertil Suppl*.

Gardner, D. (1994). Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biology International*.

Germoush, M., Al-Mutary, M., Al-himaidi, A., Al-Ghadi, M., Iwamoto, D., Alanazi, Y., Al-Khedhairi, A. (2018). Effects of Follicular Fluid on Developmental Competence and Gene Expression of in vitro Fertilized Sheep Embryos. *pakistan journal of zoology*.

Gigli, I., Russo, A., y Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*.

- Gil, M., Cuello, C., Parrilla, I., Vasquez, J., Roca, J., y Martinez, E. (2010). Advances in swine in vitro embryo production technologies. *Reprod Domest Anim*.
- Gilbert, S. (2005). Biología del desarrollo. *Ed. Médica Panamericana*.
- Gordon, I. (2003). Laboratory Production of Cattle. In *Biotechnology in Agriculture Series. Wallingford: CAB International, Wallingford*.
- Gruppen, C. (2014). evolution of porcine embryo in vitro production. *theriogenology*.
- Guthrie, H., Grimes, R., Cooper, B., y Hammond, J. (1995). Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *J Anim Sci*.
- Hafez, E. (2002). Preservación y criopreservación de gametos y embriones. *VI Congreso Reproduccion e Inseminacion Artificial Paris*.
- Hansen, P. (2006). realizing the promise of IVF in cattle - an overview. *theriogenology*.
- Hutt, K., y Albertini, D. (2007). An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *reproductive biomedicine online*.
- Jee, B., Han, S., Moon, J., Suh, C., y Kim, S. (2008). Influence of well-defined protein source on in vitro maturation of human oocyte: human follicular fluid versus human serum albumin. *Fertility and sterility*.

- Kakkaresy, M., Vijayakumaran, V., y Sreekumaran, T. (2010). effect of cumulus oocyte complex morphology on in vitro maturation of bovine oocytes. *Animal sciense*.
- Kim, B., Javed, M., Kang, S., Kim, D., Han, C., Huh, M., y Kamal, T. (2008). Effects of spermatozoa during in vitro meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes. *Animal reproduction science*.
- Klumpp, A. (2004). The effect of holding bovine oocytes in follicular fluid on subsequent fertilization and embryonic development.
- Krisher, R. (2004). The effect of oocyte quality on development. *journal of animal sciense*.
- Laing, J., Brinley, W., y Wagner, W. (2006). Fertilidad e Infertilidad en la Práctica Veterinaria. (Cuarta ed.). Madrid, España: McGraw -Hill Interamericana de España.
- Leisinger, C., Coffman, E., Da Silva, M., Forshey, B., y Pinto, C. (2014). Factors affecting in vitro maturation of alpaca (Lama paco) oocytes. *Animal reproduction science*.
- Limache, C. (2015). Efecto de la adición de fluido folicular al medio de maduración de ovocitos para la producción in vitro de embriones de

bovino (bos taurus). *Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann – Tacna*.

López, W. (2014). Susceptibilidad del cuerpo lúteo a la acción de la prostaglandina F2a en alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal.

Marinone, A, I, Kaiser, G, Hozbor, F, y Mucci, N. (2018). Biotécnicas reproductivas en la especie porcina: pasado, presente y futuro. *1Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Buenos Aires, Argentina*.

Mehmood, A., Anwar, M., Andrabi, S., Afzal, M., y Naqvi, S. (2011). In vitro maturation and fertilization of buffalo oocytes: the effect of recovery and maturation methods. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*.

Niederberger, C., Pellicer, A., Cohen, J., Gardner, D., Palermo, G., O'Neill, C., Labarbera, A. (2018). forty years of IVF. *fertility and sterility*.

Oberlander, G., Murgas, L., Zangeronimo, M., da Silva, A., de Alcantara Menezes, T., Pontelo, T., y Vieira, L. (2013). Role of insulin-like growth

- Factor-I and follicular fluid from ovarian follicles with different diameters on porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*.
- Onofre, F. (2019). Efecto del uso de suero fetal de alpaca en diferentes concentraciones sobre la maduración in vitro de ovocitos de alpaca (vicugna pacos) en la UNH - región huancavelica. *universidad nacional del centro del peru*.
- Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J., y Adams, G. (2005). In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*.
- Restrepo, G., Chavarria, N., y Vasquez, N. (2007). efecto de la suplementación con suero fetal bovino para la maduración in vitro de oocitos vobinos sobre su actividad mitocondrial y desarrollo embrionario. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 14-22.
- Restrepo, G., Giraldo, J., Gómez, J., Vásquez, E., Vásquez, N., Ortega, J., y Córdova, I. (2011). *efecto de los suplementos fluido folicular y suero fetal bovino sobre la maduración in vitro de oocitos equinos*. colombia: repositorio unisallista.
- Sánchez, A. (2000). Anatomía y Fisiología de Animales Domésticos. *España: Mc Graw Hill*.

- Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N., y Hosseini, S. (2005). A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. *Small Ruminant Research*.
- Silva, J., Van Den Hurk, R., y Figueiredo, J. (2016). Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domestic animal endocrinology*.
- Soede, N., Bouwman, E., Lanjendijk, P., van der Laan, I., Canora, A., y Kemp, B. (2007). Follicular development during Luteal Phase and Altrenogest Treatment in Pigs. *Reprod Dom Anim*.
- Tatemoto, H, Sakurai, N, y Muto, H. (2000). Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*.
- Tesfaye, D., Menjivar, N., y Gebremedhn, S. (2022). Current knowledge and the future petential of extracellular vecides in mammalian reproduction. *reproduction, fertility and development*.
- Turpo, N., Durand, M., Marocho, L., y Guerra, U. (2015). Efecto de dos métodos de colección sobre la cantidad y calidad ovocitaria de alpacas (vicugna pacos) y llamas (lama glama) post mórtem. *Revista Investigaciones Altoandinas*.

- Urrego, R., y Restrepo, G. (2006). Implicaciones de biotecnología reproductiva en la producción animal. *Revista CES medicina veterinaria y zootecnia*.
- Van Woudenberg, A., Gröllers-Mulderij, M., Snel, C., Jeurissen, N., Stierum, R., y Wolterbeek, A. (2012). The bovine oocyte in vitro maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. *Reproductive Toxicology*.
- Vivanco, H. (2007). *situacion y proyeccion de la ganaderia peruana. mejoramiento genetico y reproductivo animal*. lima- peru.
- Wigglesworth, K., Lee, K., O'Brien, M., Peng, J., Matzuk, M., y Eppig, J. (2013). Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proceedings of the National*.
- Yang, Z., y Chian, R. (2017). Development of in vitro maturation techniques for clinical applications. *Fertility and sterility*.
- Zhao, X., Wang, N., Hao, H., Li, C., Zhao, Y., Yan, C., Zhu, H. (2018). Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events.

## ANEXOS

### *Anexo 1 Registro de recuperación de ovocitos*

| FECHA      | N°<br>OVARIO | TRATAMIENTO | N°<br>OVOCITOS | CALIDAD |    |    |
|------------|--------------|-------------|----------------|---------|----|----|
|            |              |             |                | A       | B  | C  |
| 12/02/2025 | 26           | Control     | 27             | 4       | 23 | 0  |
|            |              | FF          | 30             | 6       | 24 | 0  |
|            |              | SFB         | 31             | 6       | 25 | 0  |
| 19/02/2025 | 26           | Control     | 40             | 3       | 37 | 0  |
|            |              | FF          | 35             | 6       | 29 | 0  |
|            |              | SFB         | 50             | 6       | 44 | 0  |
| 26/02/2025 | 26           | Control     | 42             | 5       | 37 | 0  |
|            |              | FF          | 43             | 6       | 37 | 0  |
|            |              | SFB         | 56             | 7       | 49 | 0  |
| 05/03/2025 | 26           | Control     | 41             | 5       | 31 | 5  |
|            |              | FF          | 43             | 5       | 32 | 6  |
|            |              | SFB         | 59             | 7       | 47 | 5  |
| 12/0/23025 | 28           | Control     | 66             | 3       | 55 | 8  |
|            |              | FF          | 63             | 4       | 49 | 10 |
|            |              | SFB         | 82             | 5       | 65 | 12 |

*Nota: FF fluido folicular; SFB: suero fetal bovino; A, B y C: calidad de ovocito*

**Anexo 2** Registro de maduración in vitro

| FECHA      | TRATAMIENTO | N° Ovocitos | N° POCILLO | HORA DE MIV |
|------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| 12/02/2025 | Control     | 27          | 1          | 12:27PM     |
|            | FF          | 30          | 2          |             |
|            | SFB         | 31          | 3          |             |
| 19/02/2025 | Control     | 40          | 1          | 12:40PM     |
|            | FF          | 35          | 2          |             |
|            | SFB         | 50          | 3          |             |
| 26/02/2025 | Control     | 42          | 1          | 12:38PM     |
|            | FF          | 43          | 2          |             |
|            | SFB         | 56          | 3          |             |
| 05/03/2025 | Control     | 41          | 1          | 12:30PM     |
|            | FF          | 43          | 2          |             |
|            | SFB         | 59          | 3          |             |
| 12/03/2025 | Control     | 66          | 1          | 1:00PM      |
|            | FF          | 63          | 2          |             |
|            | SFB         | 82          | 3          |             |

*Nota: FF: fluido folicular; SFB: suero fetal bovino; MIV: maduración in vitro*

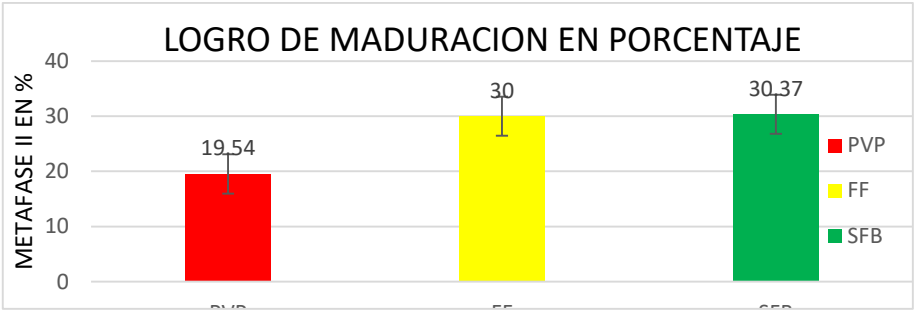
**Anexo 3** Registro de evaluación de la maduración nuclear in vitro

| FECHA      | tratamiento | VG | MI | MII | D  | Total |
|------------|-------------|----|----|-----|----|-------|
| 14/02/2025 | Control     | 3  | 4  | 4   | 0  | 11    |
|            | FF          | 10 | 6  | 6   | 6  | 28    |
|            | SFB         | 2  | 0  | 5   | 0  | 7     |
| 21/02/2025 | Control     | 18 | 11 | 7   | 4  | 40    |
|            | FF          | 7  | 3  | 6   | 15 | 31    |
|            | SFB         | 15 | 8  | 2   | 9  | 34    |
| 28/02/2025 | Control     | 14 | 17 | 4   | 7  | 42    |
|            | FF          | 3  | 1  | 0   | 1  | 5     |
|            | SFB         | 9  | 10 | 10  | 14 | 43    |
| 07/03/2025 | Control     | 17 | 8  | 10  | 5  | 40    |
|            | FF          | 18 | 13 | 16  | 6  | 43    |
|            | SFB         | 12 | 12 | 11  | 8  | 53    |
| 14/03/2025 | Control     | 13 | 15 | 9   | 4  | 41    |
|            | FF          | 11 | 20 | 28  | 4  | 63    |
|            | SFB         | 14 | 8  | 25  | 7  | 54    |

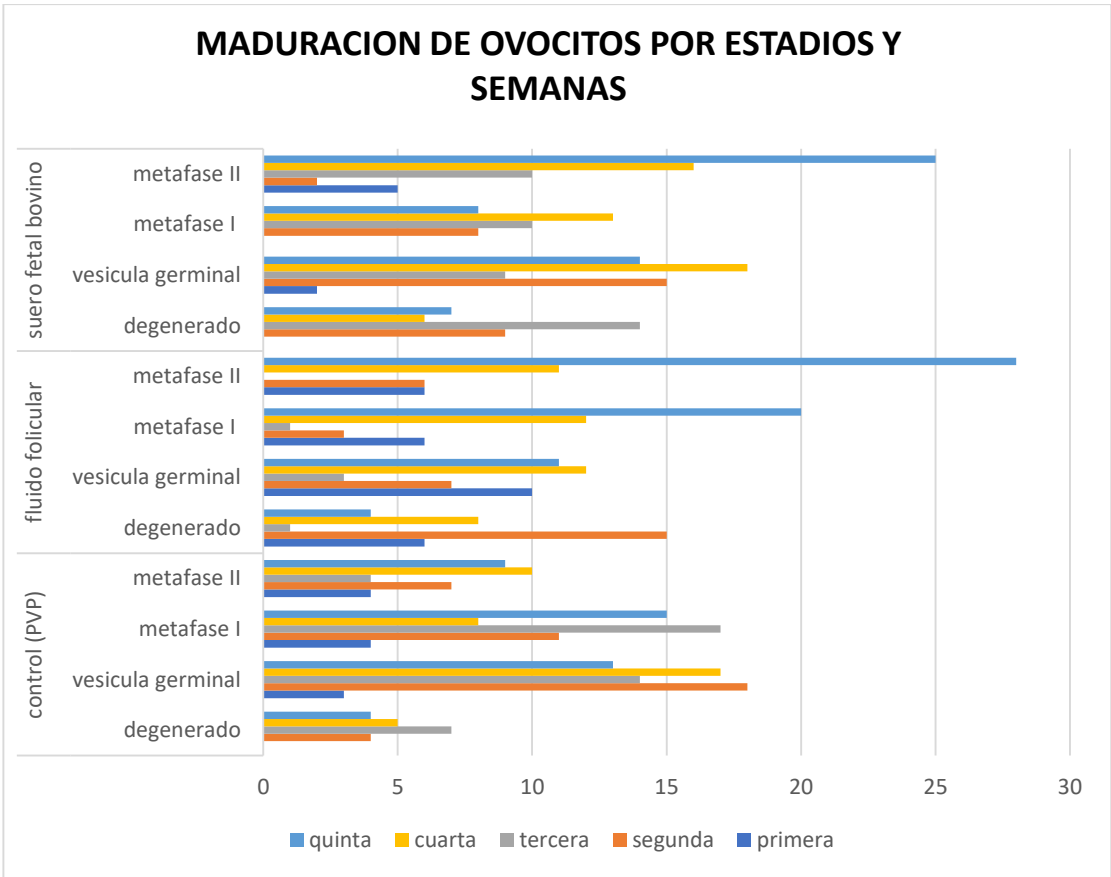
*Nota: FF: luido folicular; SFB: suero fetal bovino; VG: vesícula germinal; MI:*

*metafase I; MII: metafase II; D: degenerado*

**Anexo 4** *Porcentaje de ovocitos maduros (metafase II)*



**Anexo 5** *Maduración de ovocitos por estadios y semanas*



## Anexo 6 Análisis estadístico

\*Sin título4 [ConjuntoDatos4] - IBM SPSS Statistics Editor de datos

Archivo Editar Ver Datos Transformar Analizar Gráficos Utilidades Ampliaciones Ventana Ayuda

Visible: 7 de 7 variables

|    | tratamientos       | maduracion        | primera | segunda | tercera | cuarta | quinta | var | var | var | var | var | var |
|----|--------------------|-------------------|---------|---------|---------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1  | control (PVP)      | degenerado        | 0       | 4       | 7       | 5      | 4      |     |     |     |     |     |     |
| 2  |                    | vesicula germinal | 3       | 18      | 14      | 17     | 13     |     |     |     |     |     |     |
| 3  |                    | metafase I        | 4       | 11      | 17      | 8      | 15     |     |     |     |     |     |     |
| 4  |                    | metafase II       | 4       | 7       | 4       | 10     | 9      |     |     |     |     |     |     |
| 5  | fluido folicular   | degenerado        | 6       | 15      | 1       | 8      | 4      |     |     |     |     |     |     |
| 6  |                    | vesicula germinal | 10      | 7       | 3       | 12     | 11     |     |     |     |     |     |     |
| 7  |                    | metafase I        | 6       | 3       | 1       | 12     | 20     |     |     |     |     |     |     |
| 8  |                    | metafase II       | 6       | 6       | 0       | 11     | 28     |     |     |     |     |     |     |
| 9  | suero fetal bovino | degenerado        | 0       | 9       | 14      | 6      | 7      |     |     |     |     |     |     |
| 10 |                    | vesicula germinal | 2       | 15      | 9       | 18     | 14     |     |     |     |     |     |     |
| 11 |                    | metafase I        | 0       | 8       | 10      | 13     | 8      |     |     |     |     |     |     |
| 12 |                    | metafase II       | 5       | 2       | 10      | 16     | 25     |     |     |     |     |     |     |
| 13 |                    |                   |         |         |         |        |        |     |     |     |     |     |     |
| 14 |                    |                   |         |         |         |        |        |     |     |     |     |     |     |

\*Sin título4 [ConjuntoDatos4] - IBM SPSS Statistics Editor de datos

Archivo Editar Ver Datos Transformar Analizar Gráficos Utilidades Ampliaciones Ventana Ayuda

|    | Nombre       | Tipo     | Anchura | Decimales | Etiqueta | Valores | Perdidos | Columnas | Alineación | Medida  | Rol     |
|----|--------------|----------|---------|-----------|----------|---------|----------|----------|------------|---------|---------|
| 1  | tratamientos | Cadena   | 18      | 0         |          | Ninguno | Ninguno  | 18       | Izquierda  | Nominal | Entrada |
| 2  | maduracion   | Cadena   | 17      | 0         |          | Ninguno | Ninguno  | 17       | Izquierda  | Nominal | Entrada |
| 3  | primera      | Númérico | 8       | 0         |          | Ninguno | Ninguno  | 8        | Derecha    | Escala  | Entrada |
| 4  | segunda      | Númérico | 8       | 0         |          | Ninguno | Ninguno  | 8        | Derecha    | Escala  | Entrada |
| 5  | tercera      | Númérico | 8       | 0         |          | Ninguno | Ninguno  | 8        | Derecha    | Escala  | Entrada |
| 6  | cuarta       | Númérico | 8       | 0         |          | Ninguno | Ninguno  | 8        | Derecha    | Escala  | Entrada |
| 7  | quinta       | Númérico | 8       | 0         |          | Ninguno | Ninguno  | 8        | Derecha    | Escala  | Entrada |
| 8  |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |
| 9  |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |
| 10 |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |
| 11 |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |
| 12 |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |
| 13 |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |
| 14 |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |
| 15 |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |
| 16 |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |
| 17 |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |
| 18 |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |
| 19 |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |
| 20 |              |          |         |           |          |         |          |          |            |         |         |

Evaluar el efecto de la adición de fluido folicular y el suero fetal bovino al medio de maduración i.sav [ConjuntoDatos1] - IBM SPSS Statistics Editor de datos

Archivo Editar Ver Datos Transformar Analizar Gráficos Utilidades Ampliaciones Ventana Ayuda

Visible: 5 de 5 variables

|    | VAR00006 | VAR00007 | VAR00008 | VAR00009 | VAR00010 | var | var | var | var | var | var | var | var | var | var | var |
|----|----------|----------|----------|----------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1  | 0        | 3        | 4        | 4        | 1        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 2  | 4        | 18       | 11       | 7        | 1        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 3  | 7        | 14       | 17       | 4        | 1        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 4  | 5        | 17       | 8        | 10       | 1        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 5  | 4        | 13       | 15       | 9        | 1        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 6  | 6        | 10       | 6        | 6        | 2        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 7  | 15       | 7        | 3        | 6        | 2        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 8  | 1        | 3        | 1        | 0        | 2        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 9  | 8        | 12       | 12       | 11       | 2        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 10 | 4        | 11       | 20       | 28       | 2        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 11 | 0        | 2        | 0        | 5        | 3        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 12 | 9        | 15       | 8        | 2        | 3        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 13 | 14       | 9        | 10       | 10       | 3        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 14 | 6        | 18       | 13       | 16       | 3        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 15 | 7        | 14       | 8        | 25       | 3        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 16 |          |          |          |          |          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 17 |          |          |          |          |          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 18 |          |          |          |          |          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 19 |          |          |          |          |          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Evaluar el efecto de la adición de fluido folicular y el suero fetal bovino al medio de maduración i.sav [ConjuntoDatos1] - IBM SPSS Statistics Editor de datos

Archivo Editar Ver Datos Transformar Analizar Gráficos Utilidades Ampliaciones Ventana Ayuda

|    | Nombre   | Tipo     | Anchura | Decimales | Etiqueta           | Valores         | Perdidos | Columnas | Alineación | Medida  | Rol     |
|----|----------|----------|---------|-----------|--------------------|-----------------|----------|----------|------------|---------|---------|
| 1  | VAR00006 | Númerico | 8       | 0         | Estado degener...  | Ninguno         | Ninguno  | 8        | Derecha    | Escala  | Entrada |
| 2  | VAR00007 | Númerico | 8       | 0         | Estado vesícula... | Ninguno         | Ninguno  | 8        | Derecha    | Escala  | Entrada |
| 3  | VAR00008 | Númerico | 8       | 0         | Estado metafas...  | Ninguno         | Ninguno  | 8        | Derecha    | Escala  | Entrada |
| 4  | VAR00009 | Númerico | 8       | 0         | Estado metafas...  | Ninguno         | Ninguno  | 8        | Derecha    | Escala  | Entrada |
| 5  | VAR00010 | Númerico | 8       | 0         | Tratamientos       | {1, Control ... | Ninguno  | 8        | Derecha    | Nominal | Entrada |
| 6  |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 7  |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 8  |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 9  |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 10 |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 11 |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 12 |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 13 |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 14 |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 15 |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 16 |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 17 |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 18 |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 19 |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 20 |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |
| 21 |          |          |         |           |                    |                 |          |          |            |         |         |

**Anexo 7** Panel fotográfico

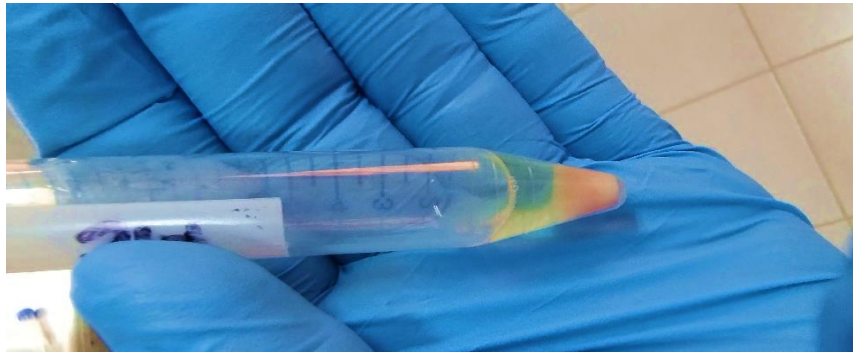
Obtención de ovarios de porcinas beneficiadas



Recuperación de folículos mediante punción de folículos



separación de los folículos del fluido folicular



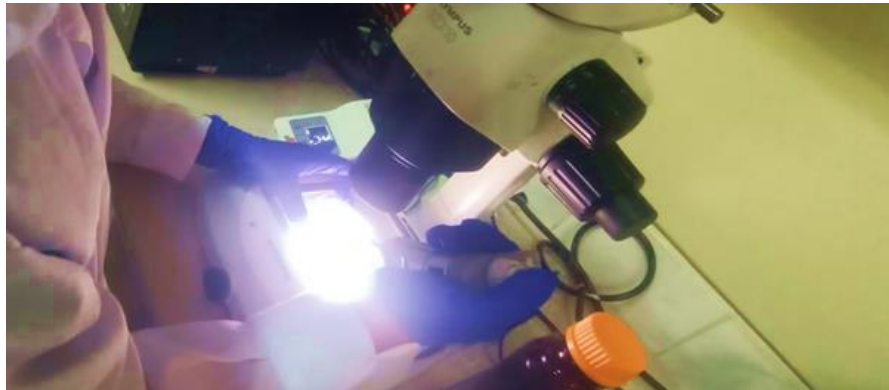
Selección de COCs



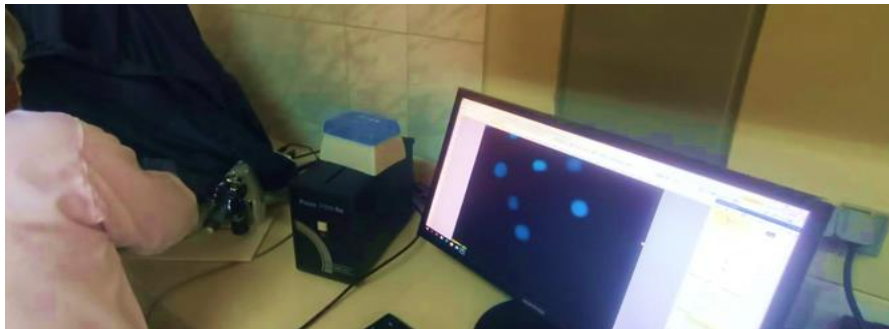
Maduración de ovocitos en incubadora



Tinción de ovocitos con Hoechst 33342; Sigma-Aldrich



Observación y evaluación del estado meiótico en el microscopio



Estado meiótico de los ovocitos bajo el microscopio invertido de fluorescencia

