

MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS DE CERDA OBTENIDOS POR PUNCIÓN Y CORTE DE FOLÍCULOS

F. Fernández Reyes*, J. E. Hernández Pichardo*, María del Carmen Reyes Flores**

*Laboratorio de Manejo de la Reproducción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X). Calzada del Hueso 1100, Colonia Villaquietud, Delegación Coyoacán, CP. 04960, México, D.F. **Clínica Privada

RESUMEN: Se recuperaron 1331 ovocitos de ovarios obtenidos en mataderos, de estos 670 fueron obtenidos por punción y 661 por corte de folículos los cuales se cultivaron en medio definido TCM-199 suplementado. La maduración fue evaluada por la técnica de fijación y tinción con orceína acética. De 302 ovocitos fijados a partir del método de punción 97 maduraron y de 294 ovocitos fijados a partir del método de corte maduraron 95 para 32.1% y 32% de maduración respectivamente. Fueron fertilizados 368 ovocitos del método de punción y 367 del método de corte en medio amortiguador TBM con Tris y posteriormente transferidos a medio de desarrollo embrionario NCSU-23. Los resultados obtenidos fueron 40 embriones en el método de punción y 36 embriones en el método de corte, para un 11.8% y 11.2% de desarrollo embrionario respectivamente. Se concluye que la eficiencia en los dos procedimientos empleados es la misma ya que no se afecta significativamente los porcentajes en la maduración y desarrollo embrionario *in vitro*.

(Palabras clave: cerda; ovocito; embrión; maduración *in vitro*; fertilización *in vitro*)

MATURATION AND FERTILIZATION IN VITRO OF SOW OOCYTES OBTAINED FOR CUT FOLLICLES AND PUNCTURE

ABSTRACT: A number of 1331 oocytes were recovered from ovaries obtained in slaughterhouses; from these 670 were obtained by puncture and 661 by follicles cutting then cultivated in the medium defined supplemented TCM-199. Maturation was evaluated by fixation and staining with acetic orcein from 302 oocytes fixed by puncture method 97 matured and from 294 oocytes fixed by cutting method 95 matured corresponding 32,1 and 32 from maturation percentage respectively, between both groups. A number 368 oocytes from the puncture method and 367 from the cutting one were fertilized in , TBM buffered medium with Tris and then transferred to the development embryo medium NCSU-23. The obtained results were 40 embryos in those of method of puncture and 36 embryos in cutting method, corresponding 11,8% and 11,2% of embryonic development respectively, not observing any significant statistical difference ($P>0.05$), between both groups. One concludes that the efficiency in both procedures of obtaining of oocytes for maturation *in vitro* of oocytes of pig and its fertilization *in vitro* is equal, since they significantly did not affect the percentage in the maturation and embryonic development *in vitro*.

(Key words: sow; cocyte; embryo; maturation *in vitro*; fertilization *in vitro*)

INTRODUCCIÓN

Los ovarios de los mamíferos contienen folículos que se encuentran en diferentes estadios de desarrollo, de los cuáles solamente una pequeña proporción

va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal (1) La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se tornarían en folículos atrésicos, con el fin de aprovechar el máximo potencial genético

de una donadora por procedimiento *in vitro* (2). Los métodos usados para la colección y la maduración de los ovocitos afectan obviamente la inducción de la meiosis, así como el potencial de desarrollo de los ovocitos (3).

Usualmente las formas de extracción de complejos cúmulo-ovocitos (COCs) de los folículos que se emplean son por punción o aspiración con jeringa (4,5) corte de folículos (3) y perfusión de oviducto (6,7) cada una de estas formas de extracción presenta ventajas y desventajas (4) El principal factor limitante para la obtención de los COCs es el tamaño de los folículos, de los cuáles se extraen (8) Una vez obtenidos el diámetro del ovocito y la morfología de los COCs, son buenos indicadores de la competencia para producir embriones (9). Dentro del folículo, la interacción paracrina entre el ovocito y las células de la granulosa es crítica y esencial para la coordinación del desarrollo folicular y función normal de la célula (10). El objetivo de la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos, es producirlos con calidad comparable a los obtenidos *in vivo* (11). Para el desarrollo se han creado medios definidos, que contienen polivinil alcohol (PVA) y suplementos como cisteína, glucosa, piruvato de sodio, factor de crecimiento epidérmico (EGF), LH y FSH (12). El manejo del pH y de la temperatura durante MIV, son parámetros importantes en el porcino según Tong *et al.* citados por Jurema y Nogueira (13).

La recolección de ovocitos es un paso necesario para poder llegar a establecer programas de fertilización *in vitro* (FIV). El desarrollo de ovocitos *in vitro* derivados de activación artificial es muy similar que el de los ovocitos derivados de fertilización *in vivo* (14). La FIV es una técnica para la reproducción asistida de mamíferos basada en el cocultivo de espermatozoides y óvulos en condiciones controladas para generar huevos que inicien el desarrollo embrionario con fines de reproducción, investigación y producción de animales seleccionados (15). Para poder fertilizar, un espermatozoide debe estar vivo, ser móvil y tener una morfología razonablemente normal (16). Para la FIV la concentración de espermatozoides y ovocitos tienen una relación de 10,000:1 (17). El uso de embriones porcinos para la investigación ha aumentado drásticamente debido a que la generación de cerdos transgénicos, el mejoramiento genético y la recuperación de cerdos con características especiales, requieren una fuente confiable de embriones desarrollados correctamente (15). Aunque los ovocitos de cerda sean madurados *in vitro*, pueden ser penetrados por el espermatozoide en condiciones adecuadas, con bajos índices de formación pronuclear y alta incidencia de polispermia,

lo que ocasiona un bajo potencial de desarrollo después de la fecundación (18).

El propósito del presente trabajo fue comparar los dos procedimientos de obtención de ovocitos (punción y corte) para corroborar la técnica más eficaz en cuanto a rapidez en la colección, cantidad y calidad de los ovocitos recuperados para su maduración, fertilización y desarrollo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron 5 ensayos, a partir ovarios de cerda provenientes del rastro. Los mismos fueron depositados en termo con 500 mL de NaCl al 0.9 %, y preservado con antibiótico antimicótico (Penicilina 10,000 U.I./mL, Estreptomicina 10,000 microgramos/mL y Amfotericina B 25 microgramos/ml.) Se transportaron al laboratorio a una temperatura entre 25 y 30°C, según Ducolomb *et al.*, (12) y Özturkler (3), en un tiempo no superior a dos horas según Abeydeera, (4) Una vez en el laboratorio los ovarios se lavaron 3 veces, con la solución señalada a temperatura ambiente.

Los COCs obtenidos por el método de punción, fueron aspirados de folículos de 3 a 5 mm, con una jeringa de 10 mL y aguja (Needle) de 1 ½ calibre 1.20 mm x 38 mm, el contenido de las jeringas se vertió en tubos cónicos de 50 mL estériles, se dejó sedimentar media hora, para la extracción del sobrenadante, y lavados del mismo con medio (TL-HEPES-PVA) con intervalos de 15 minutos para la sedimentación, se obtuvo del fondo del tubo el paquete celular. Este se depositó en una caja Petri donde se procedió a buscar y seleccionar los ovocitos con citoplasma uniforme, y rodeados de una masa compacta de células del cúmulo, de acuerdo a lo propuesto por Casas *et al.*, (19) y Ducolomb *et al.* (12).

Para obtener los COCs mediante el método de corte, con una hoja de bisturí estéril se realizaron cortes sucesivos tanto longitudinales como transversales en los folículos de 3 a 5 mm, del mismo tamaño que los del método de punción, después de cortar se aplicó medio TL-HEPES-PVA para lavar la superficie de los ovarios en forma similar a lo reportado por Özturkler, (3). El fluido resultante se depositó en una caja Petri y se vertió en tubos cónicos de 50 mL estériles, posteriormente se dejó sedimentar media hora, se extrajo el sobrenadante y se hicieron tres lavados posteriores con el mismo medio a intervalos de 15 minutos. El paquete celular se depositó en una caja Petri donde se procedió a la búsqueda y selección de ovocitos con citoplasma uniforme, y rodeados de una masa compacta de células del cúmulo, de acuerdo a lo propues-

to por Casas *et al.* (19) y Ducolomb *et al.* (12).

El cultivo *in vitro* se realizó de acuerdo a lo propuesto por Casas *et al.* (19) y Ducolomb *et al.* (12). Los COCs fueron clasificados en dos grupos de acuerdo al método de obtención: Grupo 1: obtenidos por el método de punción y Grupo 2: obtenidos por el método de corte. Una vez obtenidos los COCs, se lavaron tres veces con medio comercial de maduración TCM-199 con sales de Earle, L-Glutamina y bicarbonato de sodio libre de proteínas (IN VITRO, México), suplementado con D-glucosa, Piruvato de Sodio, PVA, Cisteína, EGF, FSH y LH, estas últimas Merional (IBSA), correspondiente a 10 μ l/ml. y para su cultivo *in vitro* fueron colocados en placas de 4 posillos (Nunc) con 500 μ l de medio de maduración, cubierto con aceite mineral (Sigma), posteriormente se incubaron a 38.5° C, con 5 % de CO₂ acorde con Coy y Romar (6), Muñoz (15), Yoshida *et al.* (25) en aire y humedad a saturación por 44 horas como lo describen Ducolomb *et al.* (12), Marchal *et al.* (24), Rath *et al.* (26).

Después de la MIV, las células del cúmulo fueron removidas con 300 μ l de hialuronidasa al 0.1 %. Los ovocitos de los dos tratamientos se agruparon, unos fueron utilizados para evaluar la maduración y otros fueron fertilizados. La maduración fue observada mediante la técnica de orceína acética al 1 % en ácido acético al 45 %. Para lo cual se colocaron entre un porta objetos y un cubre objetos para fijarlos con ácido acético y etanol (1:3) por 48 horas. Para la fertilización los ovocitos fueron desnudados y lavados dos veces en gotas de 500 μ l de medio de maduración (TCM-199 suplementado) y tres veces en gotas de 500 μ l en medio amortiguador con Tris (TBM), posteriormente se procedió a hacer la FIV (Grupo control para cada uno de los métodos), para lo cual se utilizó semen comercial (sin marca) diluido y refrigerado a 16°C, en una placa de 4 posillos se colocaron de 40 a 50 ovocitos, en gotas de 50 μ l de medio TBM cubiertas con aceite mineral, a las cuales se adicionaron 50 μ l de una solución que contenía una concentración final de 5x10⁵ espermatozoides por mL, la incubación fue a una temperatura de 38.5° C, con 5 % de CO₂ en aire y humedad a saturación, por 5 horas, trascurrido este tiempo fueron cambiados a medio de desarrollo embrionario, para lo cual se lavaron tres veces en gotas de 50 μ l de medio North Carolina State University-23 (NCSU-23) suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0.4 % y fueron transferidos a gotas de 500 μ l del mismo medio cubiertas con aceite mineral en placas de cuatro pocillos, y se incubaron en las mismas condiciones durante 72 horas.

La fertilización fue evaluada mediante el desarrollo

embrionario y fueron observados en un microscopio invertido a 400X, los resultados se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado de independencia con comparación de proporciones (20,21).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectaron 360 ovarios, de los cuales fueron recuperados 1331 ovocitos, de estos 670 fueron obtenidos por punción y 661 por corte de folículos. Los COCs se clasificaron en dos grupos para evaluar maduración: Grupo 1, del método de punción, fueron madurados *in vitro* y fijados 302 ovocitos, los resultados de maduración se muestran en la Tabla 1. El Grupo 2, del método de corte, fueron madurados *in vitro* y fijados 294 ovocitos, los resultados de la maduración se muestra en la Tabla 2. Para evaluar la maduración los ovocitos se clasificaron de la siguiente manera; aquellos sin cromatina visible o con vesícula germinal como "no maduros", los que presentaron cromatina condensada o metafase I se consideraron "en proceso de maduración" y aquellos ovocitos con cuerpo polar y metafase II como "maduros".

Por otra parte el Grupo control, 368 ovocitos del método de punción y 367 del método de corte, previamente madurados *in vitro* fueron fertilizados y cultivados *in vitro*, el número de embriones obtenidos en cada grupo se presenta en la Tabla 3.

Las tablas 1, 2 y 3 demuestran que no hubo diferencias para los indicadores evaluados (maduración *in vitro*, ovocitos fertilizados y embriones) en ambos grupos.

En el presente trabajo con el método de punción de folículos de 3-5 mm la maduración *in vitro* de los COCs cultivados fue de 32.1% (Tabla 1), inferior al 78% reportado por Yoshida *et al.* (26), al puncionar folículos del mismo diámetro; Ducolomb *et al.* (12), obtuvieron 82%. Otros autores al puncionar folículos de 3-6 mm reportan un porcentaje mayor de maduración *in vitro*; Arlotto *et al.* (22), citan 70 a 76%, de los COCs obtenidos de la periferia del ovario y de 13 a 57%, en los obtenidos de la corteza del ovario, estos autores observaron que el tamaño del ovocito (95 a 134 μ m) no afectó el porcentaje de maduración cuando fueron obtenidos de la periferia del ovario, en tanto que los ovocitos del mismo tamaño pero obtenidos de los folículos ubicados en la corteza del ovario la maduración fue menor; Abeydeera (4), obtuvo el 82% de maduración, pero al referirse al cerdo menciona que es más bajo el porcentaje de maduración de los ovocitos de folículos menores a 3 mm que los de 6mm y ha observado que en los obtenidos de folículos de 3

TABLA 1. Maduración *in vitro* de ovocitos obtenidos por el método de punción./ *In vitro* maturation of ovocytes obtained by punctation methods

Ensayo	MÉTODO DE PUNCIÓN						
	Ovocitos fijados	No maduros		En proceso de maduración		Maduros	
		Ovocitos	%	Ovocitos	%	Ovocitos	%
1	80	21	26.2	32	40.0	27	33.7
2	54	17	31.5	20	37.0	17	31.5
3	55	16	29.0	21	38.2	18	32.7
4	54	18	33.3	19	35.1	17	31.4
5	59	21	35.6	20	33.9	18	30.5
Total	302	93	30.8	112	37.0	97	32.1

TABLA 2. Maduración *in vitro* de ovocitos obtenidos por el método de corte./ *In vitro* maturation of ovocytes obtained by cutting methods

Ensayo	MÉTODO DE CORTE						
	Ovocitos fijados	No maduros		En proceso de maduración		Maduros	
		Ovocitos	%	Ovocitos	%	Ovocitos	%
1	86	28	33	34	40	24	28
2	50	18	36	19	38	13	26
3	50	15	30	22	44	13	26
4	58	16	28	17	29	25	43
5	50	13	26	17	34	20	40
Total	294	90	31	109	37	95	32

TABLA 3. Ovocitos fertilizados y embriones obtenidos por los métodos de punción y corte./ *Ovocytes fertilized and embryos obtained by punctation and cutting methods*

Ensayo	MÉTODO DE PUNCIÓN			MÉTODO DE CORTE		
	Ovocitos Fertilizados	Embriones	%	Ovocitos Fertilizados	Embriones	%
1	78	10	12.8	78	10	12.8
2	78	9	11.5	77	8	10.3
3	78	9	10.3	78	8	10.3
4	67	6	8.9	67	5	8.2
5	67	6	17.3	67	5	16.3
Total	368	40	11.8	367	36	11.2

a 6 mm, sólo 16 a 38% presentan expansión de las células del cúmulo, por lo que considera que la capacidad de desarrollo se adquiere realmente en el ovocito cuando realiza la aspiración; la diferencia obtenida en el porcentaje de maduración puede deberse al tamaño de los folículos que se puncionaron. Existe la posibilidad que al momento de puncionar folículos de 3

mm se obtengan COCs de la corteza ovárica y no de la periferia, influyendo en los resultados de maduración *in vitro*.

La maduración en los COCs obtenidos por el método de corte fue de 32% (Tabla 2), diversos estudios han evaluado la maduración bajo diferentes protocolos, así tenemos que utilizando el mismo procedimien-

to de corte; Motlik *et al.* (8), obtuvieron COCs a partir de folículos pequeños de 0.3 a 0.7 mm, de 0.8 a 1.6 mm, de 1.7 a 2.2 mm, y de 3 a 5 mm, con porcentajes de maduración de 0%, 17%, 50% y 76%, respectivamente. Al respecto mencionan que para completar la meiosis no es únicamente el tamaño ya que el tiempo de incubación es determinante, en la incubación por 24 horas obtuvieron el 8% y por 48 horas el 76% de maduración en ovocitos obtenidos de folículos de 3 a 5 mm; Bjerregaard *et al.* (23), observaron para los mismos diámetros foliculares el 21%, 27% y 20% de maduración; Wu *et al.*, (1), de folículos de 1 a 3 mm (folículos preantrales) encontraron el 51% de maduración, lo cual indica que el tamaño del folículo al momento de cortar es importante para la maduración de los ovocitos *in vitro*; Marchal *et al.* (24), de folículos de <3 mm, 3-5 mm y >5 mm, obtuvieron 44%, 77% y 86% de maduración respectivamente. Se señala además que la competencia para alcanzar la meiosis del ovocito es en folículos con un diámetro de 3 mm o más. Los resultados diferentes de maduración pueden ser consecuencia del tamaño de los folículos que se cortaron ya que en los de 3 mm puede existir la posibilidad de que al igual que los obtenidos por punción se obtengan COCs de la corteza ovárica y no de la periferia, lo que influye en los resultados de maduración *in vitro*.

La maduración obtenida en los dos métodos utilizados fue similar, aunque inferior a lo reportado por Özturkler (3), quien obtuvo un porcentaje de 95% y menciona que ésta fue similar entre los folículos puncionados de 2-5 mm y folículos cortados de 4-6 mm. Se supone que los COCs obtenidos por corte son de mejor calidad por no estar expuestos al daño que ocasiona el proceso de succión como lo reporta Muñoz (15), lo cual no fue manifiesto en el presente trabajo, posiblemente debido a que se aplicó el mismo procedimiento de selección para los dos grupos (punción y corte).

En general se considera de acuerdo con Arlotto *et al* que la maduración puede variar dependiendo del lugar en donde se ubicaron los folículos al momento del estudio.

En cuanto a los embriones no hubo diferencia en el porcentaje obtenido por punción 11.8% o corte 11.2% (Tabla 3). Aunque son inferiores a los reportados por otros autores que usaron el procedimiento de punción entre ellos encuentra: Abeydeera (4), obtuvo el 38%; Ducolomb *et al.* (12), obtuvieron 70% y Yoshida *et al.* (25), obtuvieron 24%. Por otra parte usando el procedimiento de corte los porcentajes de fertilización son diferentes a los reportados por Marchal *et al.*, (24),

quienes encontraron 53%, 73% y 77% de fertilización y 3%, 14% y 23% de blastocistos en folículos de <3 mm, 3-5 mm y >5 mm, respectivamente y Wu *et al.* (1), observaron 13% de blastocistos. La diferencia se atribuye al menor por ciento de maduración obtenido en este estudio.

Se concluye que la eficiencia es igual en los dos procedimientos de obtención de ovocitos de cerda (punción y corte) para maduración y desarrollo embrionario *in vitro*, se sugiere obtener ovocitos de folículos de 3 a 5 mm que se encuentren en la periferia del ovario, ya que estos tendrán mejor capacidad para continuar con su maduración y desarrollo *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Rastro Los Arcos de Los Reyes, La Paz, Estado de México, la donación de los ovarios.

REFERENCIAS

1. Wu J, Emery BR, Carrell DT. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod.* 2001;64:375-381.
2. Gordon I, Lu H. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology.* 1990;33(1):77-87.
3. Özturkler Y. *In vitro* developmental potencial of electro-activated porcine oocytes collected by puncturation versus dissection. *Indian Vet J.* 2002;79:327-330.
4. Abeydeera LR. *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology.* 2002;57:257-273.
5. Frei OMA. Desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos fecundados con espermatozoides adheridos al cumulus. Tesis de Licenciatura en Ciencias Veterinarias. Universidad Católica de Temuco. Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias. Escuela de Medicina Veterinaria. Temuco, Chile. 2004.
6. Coy P, Romar R. *In vitro* production of pig embryos: a point of view. *Reprod Fert Develop.* 2002;14:275-286.
7. González PEI, Navarrete SLF, Cruz TAA, Domínguez RA, Sanginés GJR, Ramón UJP. Influencia de la suplementación en la dieta con

- levaduras y minerales sobre la producción de ovocitos de ovejas púberes estimuladas ováricamente. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2007;17(1):77-82.
8. Motlik J, Crozet N, Fulka J. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fertil*. 1984;72:323-328.
 9. Anguita B, Jiménez-Macedo AR, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expresión and MPF activity in prepuberal goat oocytes. *Theriogenology*. 2007;67:526-536.
 10. Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expresión and its role in oocyte growth. *Rev Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4(19):1-8.
 11. Gonzáles-Figueroa H, Gonzáles-Molfino HM. Maturation of pig oocytes *in vitro* in a médium with pyruvate. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(6):869-872.
 12. Ducolomb RYC, Romo GS, Balcázar SJA, Rodarte CLF, Casas HE, Fragoso GGC, et al. Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos *in vitro*. *Técnica Pecuaria México*. 2005;43(3):425-432.
 13. Jurema MW, Nogueira D. *In vitro* maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertil Steril*. 2006;86(5):1277-1291.
 14. Amano T, Mori T, Watanabe T. Activation and development of porcine oocytes matured *in vitro* following injection of Inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Anim Reprod Sci*. 2004;80:101-112.
 15. Muñoz VMA. Fertilización *in vitro* en cerdos. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Posgrado en Biología Molecular. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. San Luis Potosí, SLP. 2005.
 16. Saacke RG. Fertilidad del toro: una opinión sobre su estado actual y perspectivas. *Taurus, Bs. As*. 2003;5(19):18-28.
 17. Ward F, Enight B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: Effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*. 2002;57:2105-2117.
 18. Hunter MG. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod*. 2000;5:122-130.
 19. Casas E, Betancourt M, Bonilla E, Duculomb Y, Zayas H, Trejo R. Changes in cycling B localisation during pig oocyte *in vitro* maturation. *Zygote*. 1999;7(2):21-26.
 20. Kuehl RO. Diseño de Experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de Investigaciones. *Ed. Thomson Learning*. 2001; 10, 13, 14, 107-108.
 21. Wayne WD. Biostatística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. 4ª. *LIMUSA*, México. 2008; pp.588-599.
 22. Arlotto T, Schwart JL, Fist NL, Leibfried ML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1996;45:943-956.
 23. Bjerregaard B, Wrenzycki C, Philimonenko VV, Hozac P, Laurincik J, Niemann H, et al. Regulation of ribosomal RNA synthesis during the final phases of porcine oocyte growth. *Biol Reprod*. 2004;70:925-935.
 24. Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*. 2002;57:1523-1532.
 25. Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T, Nagai T. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*. 1993;39:1303-1311.
 26. Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Jonhson LA. *In vitro* production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs alter embryo transfer. *J Anim Sci*. 1999;35:85-94.

(Recibido 11-9-2009; Aceptado 11-1-2010)