

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE FSH Y LH EN EL MEDIO SOBRE LA MADURACIÓN Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO *in vitro* DE OVOCITOS DE CERDA

F. Fernández Reyes*, J.E. Hernández Pichardo* y María del Rocio Rosales Ávila**

*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 1025 ovocitos de ovarios de cerdo obtenidos en mataderos, de estos 165 (tratamiento 1) se maduraron con 0.75 U.I. de FSH y 0.75 U.I. de LH y 125 (tratamiento 2) con 1.5 U.I. de FSH y 1.5 U.I. de LH, la maduración fue evaluada por fijación con alcohol-ácido acético y teñido con orceína acética. Se obtuvo un 40 % y 39.2 % de ovocitos madurados para los tratamientos 1 y 2 respectivamente, sin diferencia estadística significativa entre los mismos. En los dos tratamientos para la fertilización *in vitro* se evaluó la maduración de los ovocitos mediante la observación de cuerpo polar, los cuales fueron divididos en dos grupos: se obtuvieron 155 ovocitos madurados con el primer tratamiento y 137 ovocitos con el segundo tratamiento, lo que corresponde a 42.1% y 37.3% de madurados, respectivamente. Como resultado de la fertilización *in vitro* se obtuvieron 122 embriones en sus diferentes etapas alcanzando, 76 embriones en el primer tratamiento y 46 con el segundo tratamiento, para un 49%^a y 33.5%^b (a diferente de b P<0.05). Se concluye que si bien el suplemento de FSH y LH al medio de maduración TCM-199 *in vitro*, no afectó significativamente la maduración, en el desarrollo de embriones se obtuvo un mayor porcentaje de mórulas y desarrollo embrionario con el empleo de 0.75 U.I. de FSH y 0.75 U.I. de LH.

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

EFFECT OF THE ADDITION OF FSH AND LH IN MEDIUM ON THE MATURATION AND THE EMBRYONIC DEVELOPMENT *in vitro* OF OOCYTES OF SOW

ABSTRACT: One thousand twenty five oocytes from sow ovaries, obtained in slaughter houses were recovered. From them, 165 (treatment 1) were matured with 0.75 U.I. of FSH and 0.75 U.I. of LH, and 125 (treatment 2) with 1.5 U.I. of FSH and 1.5 U.I. of LH. Maturation was evaluated by fixation with alcohol-acetic acid and stained with acetic orcein. There was a 40% and 39% of matured oocytes from the treatments 1 and 2 respectively, without significant statistical differences among them. In the two treatments for *in vitro* fertilization, the maturation of oocytes was evaluated by polar body observation. They were divided into two groups: one having 155matured with the first treatment and the other having 137 oocytes with the second treatment, which corresponded to a 42.1% and 37.3% respectively. As result of *in vitro* fertilization, 122 embryos were obtained in their different stages, reaching 76 with the first treatment and 46 with the second one, for a 49% and 33.5% (a different fom b p <0.05) respectively. It is concluded that even though FSA and LH supplement to the maturation medium TCM-199 (*in vitro*) did not significantly affect such maturation, in the development of embryos, there was a higher percentage of morulas and embryonic development with the use of 0.75U.I. of FSH and 0.75 0.75U.I: of LH.

(Key words: pig; oocyte; embryo; maturation *in vitro*; fertilization *in vitro*)

INTRODUCCIÓN

Los ovocitos son células altamente especializadas y las únicas dependientes de la introducción de ácido desoxirribonucleico (ADN) externo, proveniente del espermatozoide para poder llevar a cabo las siguientes fases de desarrollo (1). Los ovocitos pueden ser obtenidos de ovarios provenientes de animales sacrificados en el matadero, los cuales son una fuente abundante de ovocitos obtenidos a bajo costo, que pueden ser madurados, fertilizados y cultivados *in vitro* hasta estados avanzados del desarrollo embrionario (2,3). El diámetro del ovocito y la morfología del complejo cúmulo-ovocito (COCs), son buenos indicadores de la competencia ovocitaria para producir embriones (4). Se ha demostrado que la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de cerda en medios definidos, produce embriones viables (5). Las secuencias detalladas de los eventos que ocurren durante el crecimiento del ovocito *in vivo* deben imitarse lo máximo posible, para soportar el crecimiento del ovocito *in vitro* (1). Para incrementar la eficiencia y reproductividad en la MIV y fecundación *in vitro* (FIV), así como el desarrollo embrionario, se han creado medios definidos, estos medios son suplementados con polivinil alcohol (PVA), cisteína, glucosa, piruvato de sodio, factor de crecimiento epidérmico (EGF), LH y FSH (5). En la cerda se han realizado diferentes modificaciones en las técnicas para cultivo de embriones, la adición de hormonas FSH y LH, así como EGF en los medios de cultivo para maduración de los ovocitos han resultado más eficientes, con ellas se han obtenido embriones de calidad y aptos para su desarrollo (6). Los COCs recuperados de los folículos pueden ser madurados *in vitro* en un medio adecuado como el TCM-199, suplementado con FSH y LH (7). Asimismo se han utilizado diversos medios de maduración (8,9,10), de los cuales el más común es el medio TCM-199 suplementado con gonadotropinas. La FSH induce expansión de las células del cúmulo y maduración nuclear *in vitro* (11). Mattioli *et al.* (12) demostraron que la mezcla de FSH y LH acelera y facilita la progresión mitótica del ovocito. La estimulación con FSH, tiene un efecto positivo sobre la calidad de los ovocitos para MIV obtenidos por punción folicular (13). La interacción paracrina entre el ovocito y los factores circundantes de las células de la granulosa es crítica *in vivo* para el desarrollo y función normal del mismo (14). En la MIV se debe prestar especial atención al manejo del pH y la temperatura, para asegurar la síntesis de proteínas y mantener estable la morfología del eje meiótico, ya que las alteraciones en estos parámetros ocasionan una disminución sobre la capacidad de maduración y fertilización de los ovocitos

(15). A pesar de que las condiciones de cultivo para la MIV de los ovocitos de especies domésticas se han mejorado notablemente, la capacidad de desarrollo de los ovocitos madurados *in vitro* aún es limitada (16).

Una vez que los COCs han madurado y los espermatozoides han sido capacitados *in vitro*, se hace la FIV, para que ocurra la penetración de espermatozoides capacitados en los ovocitos madurados (1), para concluir este proceso ambos gametos deben ser cocultivados en medio TCM-199 (17), por unas 6 horas (18). Los embriones obtenidos pueden ser transferidos a receptoras sincronizadas o congelados (19) El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos concentraciones de FSH y LH sobre la maduración de ovocitos de cerda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron 300 ovarios de cerda provenientes del Rastro Frigorífico "Los Arcos" y fueron depositados en un termo con 500 mL de NaCl al 0.9 % adicionada con antibiótico antimicótico a temperatura ambiente y se transportaron al laboratorio "Manejo de la Reproducción" de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Xochimilco en un tiempo no superior a dos horas y a una temperatura de entre 25° C y 30° C, de acuerdo a lo propuesto por Ducolomb *et al.*, (5). Una vez en el laboratorio los ovarios se lavaron 3 veces (500 mL) por lavado, con la misma solución, está se encontraba a temperatura ambiente.

Los COCs fueron obtenidos por aspiración 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, posteriormente se dejó sedimentar media hora, se extrajo el sobrenadante y se hicieron tres lavados posteriores con medio (TL-HEPES-PVA) con intervalos para la sedimentación de 15 minutos, después del último lavado se obtuvo el paquete celular el cual se depositó en una placa de Petri donde se procedió a buscar y seleccionar los ovocitos con citoplasma uniforme, y rodeados de una masa compacta de células del cúmulo.

Los criterios de selección fueron los descritos por Sánchez y Silva, (13), bajo lupa estereoscópica a un aumento de 20X, fueron clasificados como aptos (categorías I y II) y no aptos (categorías III y IV) para la MIV, basándose en las características de las células del *cumulus oophorus*, corona radiada y la homogeneidad del citoplasma.

- Ovocitos categoría I (Excelentes). Presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 ó más

capas compactas del *cumulus*.

- Ovocitos categoría II (Buenos). Presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa, pero menos de 5 capas del *cumulus*.
- Ovocitos categoría III (Regulares). Presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del *cumulus* presentes son menos compactas.
- Ovocitos categoría IV (Malos). Presentan citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado y las células de la corona y del *cumulus* se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad.

El cultivo *in vitro* se realizó de acuerdo a lo propuesto por Casas *et al.*, (20) y Ducolomb *et al.*, (5). Los COCs fueron clasificados en dos grupos:

Tratamiento 1: medio comercial 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, 0.75 U.I. FSH y 0.75 U.I. LH (Merional de IBSA) correspondiente a (10 μ L/mL).

Tratamiento 2: Igual mismo medio de cultivo pero con un suplemento de 1.5 U.I. FSH y 1.5 U.I. LH (Merional de IBSA) correspondiente a (20 μ L/mL). Los ovocitos fueron lavados tres veces en su respectivo medio de maduración y fueron cultivados *in vitro* en placas de 4 posillos (Nunc) con 500 μ L de medio de maduración de acuerdo a su respectivo tratamiento, cubierto con aceite mineral (Sigma), posteriormente se incubaron a 38.5° C con 5 % de CO₂ en aire y humedad a saturación por 44 horas.

Después de la MIV, las células del cúmulo fueron removidas con 300 μ L de hialuronidaza al 0.1 %. La maduración de los ovocitos fue evaluada 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.

Los ovocitos se clasificaron de la siguiente manera; aquellos con Vesícula Germinal como; no maduros, los que presentaron cromatina en Metafase I se consideraron; en proceso de maduración, y aquellos que presentaron Cuerpo Polar y Metafase II como; maduros.

Los ovocitos desnudos se lavaron 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), después se observó la presencia de cuerpo polar y se procedió a

hacer la FIV, 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 5×10^5 espermatozoides por mL, posteriormente se incubaron a 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 medio North Carolina State University-23 (NCSU-23) suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0.4 %; después se transfirieron a gotas de 500 μ L del mismo medio cubiertas con aceite mineral en placas de cuatro posillos, y se incubaron en las mismas condiciones durante 120 horas.

El desarrollo embrionario fue evaluado en un microscopio invertido a 400X y los resultados fueron analizados mediante la prueba de Ji-cuadrada, (21,22).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un total de 1025 ovocitos, de los cuales se utilizaron 290 para evaluar maduración con adición de 2 concentraciones diferentes de FSH y LH al medio, mediante la técnica de fijación de alcohol ácido acético y tinción con orceína acética y 735 para los 2 tratamientos con observación de cuerpo polar y desarrollo embrionario.

Los resultados de maduración de 37.3 % a 42.1 %, en los 2 tratamientos (Tablas 1 y 2), fueron similares al reportado por Mattioli *et al.*, 35% (12) al adicionar 10% de suero fetal bovino al medio de maduración, pero inferior al 76% que obtuvieron al adicionar 50 ng/mL de LH y 86% al adicionar 50 ng/mL de FSH. Resultados muy similares reportan Marchal *et al.* (23), al obtener 44% de maduración al adicionar 400 ng/mL de pFSH en ovocitos obtenidos de folículos de un tamaño menor a 3 mm, pero el porcentaje de maduración con esa misma concentración de hormona fue de 86% cuando los folículos median más de 5 mm. Por otra parte Ducolomb *et al.*, (5), reportan 82% de maduración al suplementar con LH 0.5 μ g/mL y FHS 0.5 μ g/mL. Estos hallazgos concuerdan con la importancia que tienen las gonadotropinas según lo mencionan Marchal *et al.* (23), en que son uno de los factores decisivos en la MIV, ya que mejoran la maduración nuclear y la expansión del cúmulo.

El porcentaje de desarrollo embrionario 49% y 33.5%, del tratamiento 1 y 2, (Tabla 3), es inferior al 70% de ovocitos fertilizados reportados por Ducolomb *et al.* (5). El estadio de desarrollo embrionario que sobresalió fue la etapa de mórula con el 28.3%, en el

TABLA 1. Maduración “*in vitro*” de ovocitos por adición de 2 concentraciones diferentes de FSH y LH al medio, evaluada mediante la tinción de orceína acética./ *Maturation in vitro of oocytes by adding 2 different concentration of FSH and LH to the médium , evlauated by the acetic orcein staining*

Ensayo	Tratamiento Hormonal						Ovocitos fijados
	0.75 U.I. FSH y LH			1.5 U.I. FSH y LH			
	VG*	MI**	MII***	VG*	MI**	MII***	
1	3	6	11	3	1	6	30
2	3	3	4	7	2	1	20
3	3	2	5	2	2	6	20
4	5	3	3	4	3	4	22
5	6	4	10	6	6	8	40
6	7	54	33	13	27	24	158
Total	27/165	72/165	66/165	35/125	41/125	49/125	290
%	16.3	43.6	40.0^a	28	32.8	39.2^a	100

*VG = No madurados. **MI = En Proceso de maduración. ***MII = Madurados

a = literales iguales indican que no hay diferencia estadística significativa (P>0.05), en la maduración de ovocitos madurados con los dos tratamientos.

TABLA 2. Maduración “*in vitro*” de ovocitos por adición de 2 concentraciones diferentes de FSH y LH al medio, evaluada mediante la tinción de orceína acética y presencia de cuerpo polar./ *Maturation in vitro of oocytes by adding 2 different concentration of FSH and LH to the médium , evlauated by the acetic orcein staining and the presence of polar body*

Ensayo	Ovocitos maduros evaluados por fijación y tinción con aceto-orceína		Ovocitos maduros evaluados por presencia del cuerpo polar.	
	Tratamiento Hormonal		Tratamiento Hormonal	
	0.75 U.I. FSH y LH	1.5 U.I. FSH y LH	0.75 U.I. FSH y LH	1.5 U.I. FSH y LH
1	11	6	30	25
2	4	1	36	33
3	5	6	27	19
4	3	4	18	16
5	10	8	34	31
6	33	24	10	13
TOTAL	(66 / 165)	(49 / 125)	(155 / 368)	(137 / 367)
%	40.0^a	39.2^a	42.1^a	37.3^a

a = literales iguales indican que no hay diferencia estadística significativa (P>0.05), en la maduración observada con los dos procedimientos.

Tratamiento 1, en tanto que Ducolomb *et al.*, (5), reportan 14% en estado de blástula. Por otra parte Marchal *et al.*, (23), obtuvieron 53% de fertilización y 3% de blastocistos en folículos pequeños, 73% de fertilización y 14% de blastocistos en folículos medianos y 77 % de fertilización y 23% de blastocistos en folículos grandes. Esta diferencia en el desarrollo embrionario comparado con otros autores puede ser por la manipulación durante el proceso. En tanto que la diferencia observada a favor del tratamiento 1, puede ser debido a que las concentraciones de FSH y LH actúen en forma sinérgica, permitiendo de manera particular la acción de la LH sobre la maduración

del citoplasma, lo que facilita la formación del pronúcleo masculino y el desarrollo embrionario. Además la LH interviene en la selección de las moléculas enviadas por las células somáticas al ovocito y puede ser importante en el efecto regulatorio que ejercen durante la maduración del mismo (12).

En el presente estudio no se obtuvieron blastocistos en un periodo de incubación de 120 horas, posiblemente porque el desarrollo embrionario está comprometido con defectos de maduración de los ovocitos Hunter, (24). Estos defectos pueden ser ocasionados desde el momento de la obtención de los COCs por el método de punción ya que puede

TABLA 3. Desarrollo embrionario “*in vitro*”, de ovocitos madurados “*in vitro*” con adición de 2 concentraciones diferentes de FSH y LH al medio./ *Embryonic development “in vitro” of oocytes matured in vitro adding 2 different concentrations of FSH and LH to the medium*

Ensayo	Tratamiento Hormonal									
	0.75 U.I. FSH y LH					1.5 U.I. FSH y LH				
	Número de Blastómeros					Número de Blastómeros				
	2	4	8	16	Mórula	2	4	8	16	Mórula
1	1	0	1	0	10	1	0	0	0	4
2	6	2	1	0	13	5	1	1	4	4
3	0	1	0	0	3	0	1	3	0	1
4	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0
5	6	1	0	0	6	3	4	1	0	1
6	7	1	2	0	10	8	4	0	0	0
Subtotal	20	8	4	0	44	17	10	5	4	10
%	12.9	5.1	2.5	0	28.3	12.4	7.2	3.6	2.9	7.2
Total	76/155 (49%)^a					46/137 (33.5%)^b				

a, b = literales diferentes indican que hay diferencia estadística significativa ($P > 0.05$), en el porcentaje de desarrollo embrionario entre los dos tratamientos.

ocasionar un daño del 20%. Esta disminución en las tasas de recuperación puede estar asociada a efectos nocivos sobre las capas de las células del cúmulo, ejercidas por la fuerza de aspiración Muñoz, (25). Aunque los ovocitos porcinos de MIV/FIV puedan convertirse en blastocistos en un medio de cultivo simple de maduración con gonadotropinas, la eficacia es relativamente baja (26). Asimismo Coy *et al.*, (17), plantean que aunque se ha demostrado que pueden producirse cerdos vivos mediante FIV, los avances en esta área han sido escasos debido principalmente a las dificultades en la maduración de los ovocitos, la técnica de la FIV propiamente dicha y el cultivo de embriones. En México, Ducolomb *et al.*, (5), han llevado a cabo estudios utilizando la metodología de FIV en cerdos, a la fecha se tiene un reporte de dos cerditos nacidos por esta técnica, lo cual hace necesario el ampliar este espacio de conocimiento

Se concluye que el suplemento de 0.75 U.I. FSH y 0.75 U.I. LH, comparado con el suplemento de 1.5 U.I. FSH y 1.5 U.I. LH, al medio de maduración TCM-199 *in vitro*, no afectó significativamente la maduración. Posiblemente existe un nivel de saturación en los receptores afines a estas hormonas, de tal forma que aunque se adicione una mayor concentración no se observe ningún incremento en la maduración nuclear o del citoplasma del ovocito.

La tinción con orceína acética es un método útil para evaluar la maduración, ya que es más fácil de realizar y resultó muy similar a la evaluación de la presencia de cuerpo polar.

Después de la fertilización *in vitro*, se obtuvo un mayor porcentaje de embriones y mórulas con el primer tratamiento, posiblemente porque en estas concentraciones las hormonas actúan en forma sinérgica y de esta forma se manifieste la acción de la LH sobre la maduración del citoplasma, lo que facilita la formación del pronúcleo masculino y el desarrollo embrionario. Es necesario realizar más estudios para confirmar la acción de las gonadotropinas en la MIV de ovocitos de cerda y su desarrollo embrionario *in vitro*.

Se logró un mejor resultado con 0.75 U.I. FSH y 0.75 U.I. LH, a pesar de las dificultades conocidas y la necesidad de más estudios para corroborar lo obtenido.

AGRADECIMIENTOS

Al Rastro Los Arcos de Los Reyes La Paz, Estado de México, por la donación de los ovarios.

REFERENCIAS

1. García, R. E. 2005. Análisis de diferentes factores que afectan al rendimiento de la inyección intracitoplasmática (ICSI) de espermatozoides en la especie porcina. Universidad de Murcia. Tesis [Citado 27 Junio 2008] disponible en la World Wide Web: <http://www.tdr.cesca.es/TDR-1124105-133538/index-cs.html>

2. Blondin P, Coenen K, Guibault LA, Sirard MA. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*. 1997; 47: 1061-1075.
3. 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.
4. Anguita B, Jiménez-Macedo AR, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. *Theriogenology*. 2007; 67: 526-536.
5. Ducolomb RY, Romo GS, Balcázar SJA, Rodarte CLF, Casas HE, Fragoso GGC, et al. Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos in vitro. *Téc Pec Méx*. 2005; 43 (3): 425-432.
6. Abeydeera LR. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*. 2002; 57:257-273.
7. Bjerregaard B, Wrenzycki C, Philimonenko VV, Hozac P, Laurincik J, Niemann H, et al. Regulation of ribosomal RNA synthesis during the final phase of porcine oocyte growth. *Biol Reprod*. 2004;70: 925-935.
8. Funahashi H, Cantley T, Day BN. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation in vitro. *J Reprod Fertil*. 1994; 101: 159-165.
9. Mattioli M, Bacci M, Galeati G, Seren E. Development competence of pig oocytes matured and fertilization in vitro. *Theriogenology*. 1989; 31: 1201-1207.
10. Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi K, Bamba K, Kojima Y. Effect of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J Reprod Fertil*. 1992; 95: 481-485.
11. Singh B, Barbe GJ, Armstrong DT. Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Mol Reprod Dev*. 1993; 56: 1370-1375.
12. Mattioli M, Bacci M, Galeati G, Seren E. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocyte in vitro. *Theriogenology*. 1991; 36: 95-105.
13. Sánchez AE, Silva ME. Evaluación de la respuesta ovárica y calidad de ovocitos en gatas tratadas con hormona folículo estimulante (FSH) utilizando dos esquemas de administración. *Arch Med Vet*. 2003; 35 (1): 119-126.
14. Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4(19):1-8.
15. Jurema MW, Nogueira D. In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertil Steril*. 2006; 86 (5): 1277-1291.
16. Rodríguez GE. 2003. Producción in vitro de embriones caprinos: sistemas de maduración citoplasmática de ovocitos de hembras prepúberes. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis [Citado 27 Junio 2008] disponible en la Word Wide Web: <http://www.tesisenxarxa.net/TDX-0616103-204905/index.html>
17. Coy P, Romar R. In vitro production of pig embryos: a point of view. *Reprod Fertil Dev*. 2002; 14:275-286.
18. Abeydeera LR, Day BN. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen – thawed ejaculated spermatozoa. *Biol Reprod*. 1997; 57: 729-734.
19. Villarreal, R.J.H.; García, F.E.O. 2005. Producción de embriones de bovino in vitro a partir de medios de cultivo para humanos, con la utilización de hormonas HCG y FSH. *Avances en la investigación científica en el CUCBA. XVI Semana de la Investigación Científica*. 708-712.

20. 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.
21. Kuehl, R.O. 2001. Diseño de Experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de Investigaciones. Ed. Thomson Learning. pp: 10,13,14, 107-108.
22. Wayne WD. 2008. Biostatística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. 4ª. LIMUSA, México. pp.588-599.
23. 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.
24. Hunter MG. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod*. 2000;5:122-130.
25. Muñoz, V.M.A. 2005. 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, S.L.P.
26. Funahashi H, Cantley TC, Day BN. Preincubation of cumulus-oocyte complexes before exposure to gonadotropins improves the developmental competence of porcine embryos matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*. 1997;47:679-686.

(Recibido 3-1-2009; Aceptado 7-5-2009)



MISIÓN
**Contribuir a preservar
 y elevar la sanidad
 animal, vegetal
 y humana.**

Objetivos Generales

- Desarrollo de investigación en la salud animal, vegetal y humana.
- Prestación de servicios altamente especializados principalmente en enfermedades exóticas y cuarentenarias en animales y plantas.
- Tecnologías de manejo integrado de plagas en los principales cultivos agrícolas.
- Producción de medios diagnósticos y medicamentos para uso veterinario, agrícola y humano.
- Formación especializada.

40 Años al Servicio de las Ciencias Agropecuarias