



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**Evaluación de la producción de embriones porcinos *in vitro*
con la adición de Quitosán en solución**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Fernando García González

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. SALVADOR ROMO GARCÍA

UNAM FES-C

COMITÉ TUTORAL:

**Dra. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO
UNAM FES-C**

**Dra. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

MÉXICO, D.F.

Agosto 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS.

A mi esposa Angeles, por todo el apoyo que me ha brindado e impulsarme a seguir adelante, y que a pesar de las adversidades has estado a mi lado para no dejarme caer.

A mi hijo, Carlos a quien quiero demasiado, por ser un motor que nos impulsa hacia adelante y que en un futuro este trabajo lo incentive a lograr todas las metas que te propongas.

A mis padres, a quienes quiero mucho, por todo su apoyo en todos los sentidos, ya que son los pilares que me han formado desde la infancia y me han guiado para llegar hasta este punto. Que este logro es parte de ellos

A mis hermanos por apoyarme en ciertos momentos difíciles.

A todos los maestros que fueron mi guía para obtener nuevos conocimientos y por la amistad que me brindaron.

A mis compañeros y amigos tanto de la licenciatura y la maestría, por compartir muchas experiencias y por todo el tiempo que vivimos juntos.

AGRADECIMIENTOS.



A la máxima casa de estudios UNAM por permitirme realizar mis estudios y brindarme las herramientas para el desarrollo profesional.



Al programa de estudios de posgrado de la UNAM: Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

A Conacyt por el apoyo económico brindado para la realización de este estudio.

A la UNAM por el apoyo económico otorgado para realizar una estancia académica.

A mis tutores, Dr. Salvador Romo, Dra. Susana Patricia Miranda Castro y Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez porque con sus conocimientos, sugerencias y recomendaciones contribuyeron al enriquecimiento y fortalecimiento de este trabajo de investigación.

A los alumnos de la UAN Iztapalapa: Mario, Diana, Araceli por el apoyo que me brindaron, por transmitirme sus conocimientos en la técnica de producción *in vitro* de embriones y por sus consejos y amistad.

Al centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) por abrirme las puertas para vivir una gran experiencia.

Al Dr. Fernando de la Torre por su apoyo incondicional y por brindarme su amistad, por su sencillez y su calidez humana.

Al M en C Horacio Álvarez por su amistad, su apoyo y sus consejos para lograr la realización de este trabajo.

A Sandra Pérez por su apoyo con sus conocimientos y actividades en el laboratorio.

Al rastro tipo TIF "PIGAMEX" de Tepatitlán Jalisco, por su contribución con el material biológico proporcionado para realizar este trabajo.

A Sandra Padilla Villalobos y el médico Armando por brindarme acceso al rastro.

A Christian Ulloa y a GENA por su apoyo con muestras de semen que fueron muy importantes para este trabajo.

A los miembros del jurado Mario Pérez Martínez, Yasmin de Loera, Salvador Romo García Adelfa de Carmen García Contreras, Jose Fernando de la Torre por su apoyo, comentarios y aportaciones para la culminación de este trabajo de tesis.

RESUMEN.

El Quitosán es un polímero parcialmente desacetilado obtenido de la desacetilación alcalina de la Quitina, la cual es un polisacárido no ramificado con base en glucosa, ampliamente distribuido en la naturaleza como el principal componente de los exoesqueletos de los crustáceos e insectos. El Quitosán tiene una variedad de propiedades fisicoquímicas y biológicas que tienen numerosas aplicaciones. Además de que no es tóxico, no es alergénico, sus características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y bioactividad hacen que sea una sustancia muy atractiva para diversas aplicaciones como un biomaterial en los campos de medicina y farmacéutica. El Quitosán estimula el crecimiento celular y se ha utilizado en cultivo de fibroblastos, incrementando la proliferación celular. Por estas razones es importante evaluar si este polímero tiene un efecto positivo en la producción de embriones. El objetivo de este estudio fue evaluar la maduración de ovocitos porcinos y el desarrollo embrionario, comparando el efecto de la suplementar el medio de maduración *in vitro* (MIV) y el medio de desarrollo *in vitro* (DIV) con diferentes concentraciones de Quitosán. Los complejos ovocito-células del cúmulo (COCs) fueron aspirados de folículos ováricos de cerdas sacrificadas. Los COCs fueron madurados en medio TCM-199 suplementado (MIV) y se incubaron durante 44 h. Todas las incubaciones se realizaron a 38.5°C, con 5% de CO₂ en aire y humedad a saturación. Después de la maduración los gametos se incubaron conjuntamente en mTBM durante 7 h. Luego los presuntos cigotos fueron cultivados en medio NCSU-23 (DIV) por 168 h. Se realizaron los siguientes experimentos: 1) Adición de 0 (testigo) y 35 ppm de Quitosán en el medio de MIV (n= 704), 2) Adición de 0, 50, 100 y 150 ppm de Quitosán en el medio de MIV (n=649), 3) Adición de 0, 50, 100 y 150 ppm de Quitosán en el DIV (n=739), 4) adición de 0, 50, 100 y 150 ppm de Quitosán primero en el medio de MIV y luego las mismas concentraciones en el DIV (n=702). Cuando se adicionó el Quitosán al MIV, el mayor porcentaje de ovocitos madurados (metafase II), se obtuvo en el tratamiento con 50 ppm ($p < 0.05$). En cuanto al porcentaje de blastocistos, no hubo diferencias con el grupo testigo. Después de la adición de Quitosán a los presuntos cigotos en el DIV, el porcentaje de mórulas en el tratamiento de 150

ppm fue significativamente mayor con respecto a los otros grupos ($p < 0.05$). Al añadir Quitosán tanto al medio de MIV y al de DIV, no hubo efecto sobre el desarrollo embrionario. Se concluye que la adición de Quitosán en el medio de MIV a una concentración de 50 ppm mejoró significativamente ($p < 0.05$) la maduración de ovocitos y una concentración de 150 ppm en el medio de DIV aumentó el porcentaje de mórulas. El Quitosán tuvo un efecto positivo, mejorando la maduración de ovocitos y el desarrollo embrionario. Estos resultados justifican futuras investigaciones para averiguar si el Quitosán puede ser útil como suplemento para los medios químicamente definidos.

Palabras clave: Quitosán, maduración *in vitro*, desarrollo *in vitro*, embrión, porcino.

ABSTRACT.

Chitosan is a partially deacetylated polymer obtained from the alkaline deacetylation of chitin which is a glucose-based unbranched polysaccharide widely distributed in nature as the main component of exoskeletons of crustaceans and insects. Chitosan has a variety of physicochemical and biological properties resulting in numerous applications. In addition to its lack of toxicity and allergenicity, and its biocompatibility, biodegradability and bioactivity make it a very attractive substance for diverse applications as a biomaterial in pharmaceutical and medical fields. Chitosan stimulates cell growth and it has been used in fibroblast culture, increasing cell proliferation. For these reasons it is important to evaluate if this polymer has a positive effect on embryo production. The aim of this study was to evaluate porcine oocyte maturation and embryo development, comparing the effect of supplementing different concentrations of Chitosan to the *in vitro* maturation medium (MIV) and to the *in vitro* development medium (DIV). Cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated from ovarian follicles of slaughtered sows. COCs were matured in supplemented TCM-199 (MIV) and incubated for 44 h. All incubations were performed at 38.5 °C, with 5% CO₂ in air and humidity at saturation. After maturation the gametes were co-incubated in mTBM for 7 h. Then, putative zygotes were cultured in NCSU-23 (DIV) for 168 h. The following experiments were performed: 1) Addition of 0 (control), 35, 50, 100 and 150 ppm Chitosan to the MIV (n=704), 2) Addition of 0, 50, 100 and 150 ppm Chitosan to the MIV (n=649), 3) Addition of 0, 50, 100 and 150 ppm Chitosan to the DIV (n=739), 4) Addition of 0, 50, 100 and 150 ppm of Chitosan to the MIV first and then the same concentrations to the DIV (n=702). When Chitosan was added to the MIV, the highest percentage of matured oocytes (metaphase II) was obtained in the 50 ppm treatment ($p < 0.05$). Regarding the percentage of blastocysts, there were no differences with the control group. After addition of Chitosan to the putative zygotes in the DIV, the percentage of morulae in the 150 ppm treatment was significantly increased with regard to the other groups ($p < 0.05$). When adding Chitosan to both, the MIV and DIV, there was no effect on embryo development. It is concluded that the addition of Chitosan to the MIV at a concentration of 50 ppm

significantly improved ($p < 0.05$) oocyte maturation and a concentration of 150 ppm in the DIV increased the percentage of morulae. Chitosan had a positive effect improving oocyte maturation and embryo development. These results justify further investigations to find out if Chitosan can be useful as a supplement for chemically defined media.

Keywords: Chitosan, *in vitro* maturation, *in vitro* development, embryo, porcine.

ÍNDICE.

Dedicatorias.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	VI
Índice.....	VIII
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 Revisión de la Literatura.....	5
2.1 Importancia del cerdo en México.....	5
2.2 Producción de embriones porcinos <i>in vitro</i>	6
2.2.1 Generalidades sobre los medios de cultivo para un sistema de producción de embriones <i>in vitro</i>	7
2.2.1.1 Medios de cultivo para la MIV.....	7
2.2.1.2 Medios de cultivo para la FIV.....	8
2.2.1.3 Medios de cultivo para el DIV.....	9
2.2.2 Recolección de ovarios.....	9
2.2.3 Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos.....	10
2.2.4 Fertilización <i>in vitro</i>	12
2.2.5 Desarrollo de embriones.....	13
2.3 Quitosán.....	16
2.3.1 Generalidades de la Quitina y obtención de Quitosán.....	16
2.3.2 Aplicaciones del Quitosán.....	18
2.3.3 Quitoooligómeros.....	19
2.3.4 Propiedades de los quitoooligómeros.....	19
2.3.5 Propiedades biológicas.....	20

3	JUSTIFICACIÓN.....	21
4	HIPÓTESIS.....	23
5	OBJETIVOS.....	23
	Objetivo general.....	23
	Objetivos específicos.....	23
6	MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
6.1	Recolección de Ovarios.....	26
6.2	Recuperación de ovocitos.....	26
6.3	Selección de complejos ovocito-células del cúmulo.....	27
6.4	Maduración de COCs.....	27
6.5	Fertilización <i>in vitro</i>	28
6.6	Desarrollo de Embriones.....	29
6.7	Evaluación de la Maduración.....	29
6.8	Evaluación del Desarrollo Embrionario.....	30
	6.8.1 Clasificación embrionaria.....	30
	6.8.1.1 Clasificación según la calidad del embrión.....	30
	6.8.1.2 Clasificación de acuerdo a la etapa de desarrollo.....	31
6.9	Análisis Estadístico.....	32
7	RESULTADOS.....	33
8	DISCUSIÓN.....	39
9	CONCLUSIONES.....	42
10	Perspectivas.....	44
11	REFERENCIAS.....	45

1 INTRODUCCIÓN.

La producción *in vitro* (PIV) de embriones porcinos ha sido de particular interés para los investigadores durante muchos años. La PIV permite producir un gran número de embriones a un costo relativamente bajo, la disponibilidad de un gran número de ovocitos madurados y embriones a través de técnicas de maduración *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) así como de desarrollo *in vitro* de embriones (DIV), es importante para las nuevas tecnologías utilizadas en la biomedicina y la ganadería (Gil *et al.*, 2010). La FIV es una técnica para la reproducción asistida de mamíferos basada en el cocultivo de espermatozoides y ovocitos en condiciones controladas para generar huevos que inicien el cultivo embrionario con fines de reproducción, investigación y producción de animales seleccionados (Fernández *et al.*, 2010).

Las aplicaciones que tiene la producción de embriones porcinos en el laboratorio son muy numerosas e incluyen la posibilidad de obtener cerdos transgénicos con las características de crecimiento, porcentajes de grasa, o resistencia a enfermedades que se seleccionen previamente. Asimismo, es importante la utilización de los cerdos como modelo biomédico en el campo de la salud humana como potenciales donadores de órganos para trasplantes (Somfai e Hirao, 2011). Por lo que estas biotecnologías requieren ovocitos maduros y cigotos de buena calidad obtenidos de forma sanitaria.

Sin embargo a pesar de la aplicación de diversas modificaciones en los sistemas de PIV, para mejorar la calidad de los embriones, el cultivo de embriones porcinos es bastante bajo; en comparación con los producidos *in vivo*, o con los embriones desarrollados *in vitro* de en otras especies tales como bovinos o ratón (Coy *et al.*, 1993, Nagai *et al.*, 2006).

Los principales problemas que se presentan en la PIV de embriones porcinos son:

- 1) La inadecuada maduración citoplasmática, que abarca una serie acontecimientos como la redistribución de las mitocondrias y gránulos corticales (GC),
- 2) Alto índice de polispermia, es decir, la penetración de los ovocitos

porcinos por más de un espermatozoide, 3) También las inadecuadas condiciones de cultivo, para los embriones producidos *in vitro* son responsables de esta baja eficacia (Nagai, 2001).

La penetración de los ovocitos por los espermatozoides en condiciones de laboratorio no es difícil, pero debido a la polispermia los embriones que se obtienen no suelen ser viables porque mueren antes de llegar a estadios de desarrollo avanzados (Dang-Nguyen *et al.*, 2011). Entre las causas que provocan la polispermia *in vitro*, se menciona una falla en la llamada “reacción de zona”. Por este mecanismo, cuando el espermatozoide contacta con la zona pelúcida del ovocito (ZP), el contenido de los gránulos corticales (GC) es liberado al espacio perivitelino modificando los receptores de la ZP y bloqueando la entrada adicional de espermatozoides. Esta falla se ha atribuido a distintas causas, entre ellas un retraso en la propia reacción de zona (Sathananthan y Trounson, 1982), a una falta de dispersión del contenido cortical en el espacio perivitelino (Cran y Cheng, 1986) o a una incorrecta maduración citoplasmática del ovocito (Galeati *et al.*, 1991; Niwa, 1993).

Zheng *et al.* (1992) reportan que el semen criopreservado se puede utilizar para FIV como alternativa para reducir el problema de la polispermia, de acuerdo a los resultados que obtuvieron, ya que el porcentaje de polispermia fue menor y la formación de los dos pronúcleos fue mayor con el uso de semen congelado que en los ovocitos expuestos a semen fresco. Incluso los espermatozoides de epidídimo congelados-descongelados podrían ofrecer ventajas frente al semen fresco tal y como ya han sugerido algunos autores (Rath y Niemann, 1997).

El éxito en la PIV de embriones porcinos a través de las técnicas de MIV-FIV tiene un gran potencial como un medio para obtener un gran número de embriones para estudios científicos, así como para su aplicación comercial (Abeydeera, 1998a).

Para lograr el éxito deseado en los sistemas de PIV de embriones, diversos autores como Beckmann y Day (1993), Petters y Wells (1993), Pollard *et al.* (1995), Dobrinsky *et al.* (1996), y Yoshioka *et al.* (2008), entre otros, han realizado

numerosos estudios para estandarizar el uso de componentes químicamente definidos, que no afecten las condiciones en las que se cultivan los embriones y que favorezcan el cultivo de los embriones durante todas sus etapas.

Una sustancia ampliamente estudiada desde mediados de la década de 1960 es el Quitosán, el cual continúa siendo estudiado sobre todo para aplicaciones biomédicas (Khor y Yong, 2003), ya que ha demostrado tener muchas propiedades como la biocompatibilidad, biodegradabilidad, además de no ser tóxico, estimula el crecimiento y maduración de plantas (Kumar, 2000), así como también ha sido utilizado en el cultivo de líneas celulares como los fibroblastos, obteniendo buenos resultados en cuanto a la proliferación de dichas células (Nguyen y Nguyen 2010). Debido a ello, la importancia de realizar estudios que nos permitan verificar si esta sustancia puede tener un efecto positivo sobre la PIV de embriones porcinos.

Se sabe que la principal fuente para obtener el Quitosán es la industria procesadora de mariscos (camarones, cangrejos, entre otros), debido a que es altamente generadora de desechos sólidos, compuestos principalmente por conchas, cabezas y patas de mariscos, que representan del 75% - 85% del peso vivo de estos y que contaminan el medio ambiente, convirtiéndose en una carga económica para las industrias procesadoras de mariscos, debido a que su eliminación es problemática y costosa. En la actualidad existen alternativas tecnológicas para el aprovechamiento de estos desechos y su conversión en productos de utilidad como es el caso de la Quitina y el Quitosán. La Quitina es un polisacárido natural de alto peso molecular, fácilmente extraíble del exosqueleto de crustáceos industrialmente procesados, tales como langosta, cangrejo y camarón. El uso creciente de la Quitina, así como de sus derivados, ha sido motivado al hecho de que, al contrario de los derivados del petróleo, ésta se obtiene de los subproductos de las industrias pesqueras, fuente naturalmente renovable, no tóxica y no alergénica; además, antimicrobiana y biodegradable (Mármol *et al.*, 2011).

El derivado más importante de la Quitina es el Quitosán, material más manejable, el cual puede ser procesado para formar escamas, polvos, esferas, membranas, esponjas, películas y geles, lo que le confiere características peculiares que lo hacen útil en muchas aplicaciones en el campo de la salud, cosmética, tratamiento de aguas y otros (Avila, 2010).

2 REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Importancia del cerdo en México.

La carne de cerdo es la más consumida en el mundo, se estima que la producción mundial anual es poco menos de 100 millones de toneladas. Considerando como los principales productores mundiales de carne de cerdo a países como China, Europa, Estados Unidos y Brasil. No obstante el comercio de productos porcinos entre México y EUA se incrementó notablemente en un solo sentido y su impacto sobre la porcicultura mexicana ha sido motivo constante de preocupación (Bobadilla *et al.*, 2010).

En México, durante el periodo de 1997 - 2007 las importaciones de carne de porcino han aumentado un 21.3%, debido al mayor dinamismo del consumo nacional que crece un 5.8% comparado con el 3.2% de la producción nacional (Pérez-Vera *et al.*, 2010).

En términos monetarios, 2008 representó un valor total de la producción porcina de 30 millones de pesos, aproximadamente el 12% del valor total agropecuario mexicano (Bobadilla *et al.*, 2010).

Además de su importancia en la alimentación humana, los cerdos representan un modelo biomédico apropiado para la generación de animales transgénicos, con el fin de elaborar productos biológicos y obtener órganos para xenotrasplantes, debido a la similitud fisiológica, anatómica y bioquímica con los seres humanos, con lo que los órganos obtenidos de cerdos transgénicos tendrían una aplicación para trasplantes en humanos. De acuerdo con algunas investigaciones realizadas con cerdos transgénicos, se sabe que son capaces de sintetizar proteína C, hemoglobina y sustituto de sangre humana (Gadea y García-Vázquez, 2010). Se ha reportado la producción de ratones transgénicos, en los que se ha transferido la resistencia a enfermedades parasitarias como la cisticercosis por medio del gen Qa-2 el cual está relacionado con la resistencia a la cisticercosis (Fragoso *et al.*, 1998).

2.2 Producción de embriones porcinos *in vitro*.

La PIV de embriones incluye tres pasos principales consecutivos: la MIV de ovocitos inmaduros, la FIV de ovocitos madurados y el DIV de embriones. El primer paso, la MIV, es de gran importancia, ya que proporciona los ovocitos fertilizables para llevar a cabo la PIV (Somfai e Hirao, 2011).

Se han desarrollado métodos exitosos para la MIV y FIV de ovocitos porcinos y para el DIV de embriones porcinos hasta el desarrollo de blastocisto. Sin embargo, la producción eficiente de embriones porcinos a través de las técnicas de MIV / FIV se ha visto afectada por la alta incidencia de polispermia y una baja incidencia en la formación del pronúcleo masculino.

Con el fin de incrementar la eficiencia en la MIV y FIV, así como el cultivo embrionario, se han desarrollado medios químicamente definidos, los cuales son suplementados, tratando de igualar las condiciones que se presentan en el tracto genital de la cerda, con sustancias igualmente definidas como son: alcohol polivinílico (PVA), cisteína, glucosa, piruvato de sodio, factor de crecimiento epidérmico (EGF), hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) (Ducolomb, 2005). La adición de estos suplementos al medio de maduración han demostrado dar resultados más eficientes en la maduración nuclear y la expansión de las células del cúmulo (Abeydeera y Day, 1997b, Bjrregaard *et al.*, 2004), y con ello se ha mejorado la calidad de los embriones obtenidos *in vitro* para su cultivo (Abeydeera, 2002). Algunos autores reportan la utilización de un medio básico definido para realizar el procedimiento de PIV de embriones porcinos durante todas sus etapas, solo modificando algunas moléculas que se agregan en cada una de las etapas (Yoshioka *et al.*, 2008).

2.2.1 Generalidades sobre los medios de cultivo para un sistema de producción de embriones *in vitro*.

El diseño y elaboración de medios de cultivo óptimos, para realizar un sistema de PIV de embriones porcinos debería estar en principio, enfocado en aquéllos que imiten en la medida de lo posible, las condiciones ambientales a las que está sometido el embrión en condiciones *in vivo*. De esta manera vamos a promover una actividad metabólica normal y un desarrollo máximo del embrión *in vitro*. En términos generales, un medio de cultivo embrionario debe de estar compuesto por agua, sales inorgánicas, compuestos energéticos, proteínas, aminoácidos, quelantes, hormonas del crecimiento o vitaminas y antibióticos. Una vez preparados, los medios de cultivo se esterilizan por filtración, haciéndolos pasar a través de una membrana con un diámetro de poro de 0.22 μm . Debemos de tener en cuenta que algunos de los componentes se pueden degradar espontáneamente por lo que se adicionan inmediatamente antes de su utilización (Mucci *et al.*, 2006).

En cualquier medio de cultivo se debe tener presente la osmolaridad que necesitan las células que se van a cultivar, así como el mantenimiento del pH. Los valores reportados en la literatura para estas dos variables, se ha determinado que en el caso de la osmolaridad las secreciones uterinas oscilan entre los 280 ± 20 mOsm/kg, y en el caso del pH, la mayoría de los embriones de mamíferos cultivados *in vitro* se desarrollan en pH neutro o ligeramente alcalino, encontrándose los mejores resultados entre 7.2 y 7.6 (Duque *et al.*, 2003).

2.2.1.1 Medios de cultivo para la MIV.

En el caso de la maduración *in vitro*, se han utilizado diversos medios específicos para este procedimiento (Funahashi, 1994a, Yoshida *et al.*, 1992), sin embargo y aunque los medios de MIV empleados en los ovocitos porcinos han sido numerosos, en cuanto a su composición todos coinciden con ciertos elementos básicos que se podrían clasificar, brevemente, en una fuente de componentes orgánicos (proteínas, aminoácidos, sustratos energéticos), componentes

electrolitos y otros suplementos. Clásicamente el medio utilizado para la MIV porcina ha sido el TCM-199 (medio comercial) con sales de Earle, L-Glutamina y bicarbonato de sodio (Romar *et al.*, 2001), suplementado con gonadotropinas. Los efectos de la FSH induce expansión de las células del cúmulo así como la maduración nuclear *in vitro* (Fernández *et al.*, 2009), Mattioli *et al.* (1991) demostraron que la mezcla de FSH y LH acelera y facilita la progresión mitótica del ovocito, por lo que la estimulación de los ovocitos con FSH, tiene un efecto positivo sobre la calidad de los mismos para MIV de aquellos que son obtenidos por punción folicular (Mattioli *et al.*, 1991).

2.2.1.2 Medios de cultivo para la FIV.

En la actualidad existen muchos sistemas exitosos para la FIV de ovocitos porcinos madurados *in vivo* o *in vitro* utilizando semen fresco de verraco. En todos ellos, los medios de fertilización contienen una macromolécula proteínica tal como albúmina de suero bovino (BSA) y suero fetal de ternero (FCS). Se ha demostrado que el medio que contiene BSA o FCS mejora el éxito del proceso de fertilización *in vitro* de ovocitos (Wang *et al.*, 1995).

En los procedimientos de la FIV porcina, el uso de las metilxantinas, como la cafeína y la teofilina estimulan y/o modulan la capacidad de penetración de los espermatozoides en los ovocitos madurados *in vitro* por diferentes modos de acción, como estimular y mantener la motilidad espermática, al actuar como inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE), probablemente mediante la elevación de los niveles de adenosin mono fosfato cíclico (cAMP). Se ha reportado que la cisteína mejora la formación del pronúcleo masculino de ovocitos porcinos cuando se añade al medio de MIV (Yoshioka *et al.*, 2003). Recientemente, se ha demostrado que la sustitución de la cafeína con la adenosina en los medios de fertilización aumentan la incidencia de la penetración monospérmica (por un solo espermatozoide) de ovocitos porcinos con semen congelado (Funahashi *et al.*, 2000).

2.2.1.3 Medios de cultivo para el DIV.

En porcino se han utilizado gran cantidad de medios de cultivo para el DIV desde el estadio de cigoto hasta el de blastocisto. Entre ellos destacan el medio Whitten (Beckmann y Day, 1993), NCSU 23 (Petters y Wells, 1993), Bavister (Pollard *et al.*, 1995), BECM-3 (Dobrinsky *et al.*, 1996) o PZM 5 (Yoshioka *et al.*, 2008). De todos ellos, el más utilizado por los buenos resultados obtenidos, ha sido el NCSU 23. Yoshioka *et al.* (2002) realizaron un estudio sobre medios basado en la composición del fluido oviductal porcino en el que no suplementaban con glucosa y lo compararon con el NCSU23. A pesar de que los resultados obtenidos fueron similares en cuanto a calidad embrionaria, lo novedoso de este medio fue que estaba químicamente definido.

2.2.2 Recolección de ovarios.

Para tener éxito en un programa de PIV de embriones porcinos, es necesario realizar una adecuada recolección de ovarios. Los ovarios de los mamíferos contienen folículos que se presentan en diferentes estadios de desarrollo, de los cuáles solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar aquellos folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas del animal, se tornarían en folículos atrésicos, por ello se recurre a estas técnicas de recolección de ovocitos con la finalidad de aprovechar al máximo el potencial genético de una donadora con los procedimiento *in vitro* (Fernández *et al.*, 2010).

En general, los ovarios de las cerdas prepúberes recolectados en un rastro son la principal fuente de ovocitos para los procedimientos de rutina, utilizados para la maduración *in vitro* (Coy y Romar, 2002). Por ello es de gran importancia cuidar factores como la temperatura de transporte y el tiempo de recolección de los ovarios hasta el momento de la aspiración de los ovocitos, ya que pueden influir en la calidad de los mismos. Por lo tanto, mantener la viabilidad de los ovocitos durante este proceso es fundamental para lograr la maduración de los mismos con éxito. Walters y Graves (1998) evaluaron diferentes temperaturas de

almacenamiento de ovarios (5, 16, 25, 30 y 37° C), así como el tiempo de almacenamiento (2, 6, 10, 14 y 26 h) y el efecto que estas pueden tener sobre la maduración de los ovocitos. En todas las temperaturas probadas por estos investigadores, la maduración de ovocitos se redujo significativamente a medida que el intervalo de almacenamiento se prolongó. Más del 75% de los ovocitos completaron la maduración cuando se almacenaron por un periodo de hasta 5 h a 25 °C. A partir de este estudio los investigadores concluyeron que el almacenamiento durante 5 h con intervalos de temperaturas superiores o inferiores a 25 °C pone en peligro la capacidad de los ovocitos para completar la maduración y lo más probable es que interfiera con su desarrollo posterior. En el caso de los ovocitos recuperados de ovarios almacenados durante 8 h a 37 °C, después de la MIV y la FIV estos investigadores observaron que se producen significativamente menos embriones que los que fueron almacenados a 25 °C Por lo tanto concluyeron que las condiciones más adecuadas para el transporte de los ovarios es a una temperatura de 25 °C durante un máximo de 5 h para que los ovocitos recuperados tengan la capacidad de completar la maduración y el desarrollo embrionario después de la fertilización (Abeydeera, 2002).

2.2.3 Maduración *in vitro* de los ovocitos.

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 (Wu *et al.*, 2001). Usualmente las técnicas que se emplean para la extracción de COCs a partir de los folículos son por punción o aspiración con jeringa (Abeydeera, 2002). Una vez obtenidos los ovocitos, el diámetro y la morfología de los COCs son buenos indicadores de la competencia ovocitaria para producir embriones (Anguita *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la MIV de ovocitos porcinos en medios definidos, produce embriones viables (Ducolomb *et al.*, 2005).

No obstante, la recolección de ovocitos obtenidos de folículos con un tamaño entre 3 y 6 mm no garantiza una población de ovocitos en la misma etapa de desarrollo,

por lo que es necesario someterlos a un proceso de maduración (Somfai e Hirao, 2011).

En general, el proceso de maduración de los ovocitos se puede dividir en dos aspectos:

- Maduración nuclear es un término que se refiere a la reanudación de la meiosis y la progresión a la Metafase II (MII).
- Maduración citoplasmática es un término más amplio que engloba los siguientes procesos: acumulación de proteínas y mRNA; desarrollo de mecanismos reguladores de calcio; cambios en la actividad del factor promotor de la maduración (MPF) y proteína cinasa mitogénica activada (MAPK); y reorganización de organelos celulares. Estos procesos permiten que el ovocito finalice la maduración nuclear, y posteriormente se realice la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Fan y Sun, 2004).

La mayoría de los medios de MIV se complementa con gonadotropinas, específicamente, LH y / o FSH, así como otros factores de crecimiento. La adición de suplementos hormonales a los medios, mejora la maduración nuclear y expansión de los COCs. Mattioli *et al.*, (1991) encontraron que la maduración de los ovocitos al estadio de MII es significativamente mayor en la presencia de LH (76%) y FSH (86%) que en ausencia de la mismas (35%). En presencia de gonadotropinas, la suplementación con EGF no influye en la maduración nuclear. Sin embargo, la formación del pronúcleo masculino (PNM) se mejora significativamente en presencia de gonadotropinas y EGF, lo cual indica que la suplementación de los medios de cultivo, tiene efectos benéficos para mejorar la maduración citoplasmática (Abeydeera, 2002). Esto demuestra que la suplementación de los medios de cultivo con hormonas facilita la maduración nuclear hasta MII, sin embargo una gran proporción de estos ovocitos carecen de maduración citoplasmática lo cual se refleja en una baja formación de pronúcleos masculinos después de la fertilización. La disminución de la capacidad de los ovocitos porcinos madurados *in vitro* para formar un PNM parece ser debido a la

interacción defectuosa entre el medio de cultivo, las células del cúmulo y el citoplasma del ovocito durante la MIV (Abeydeera y Day, 1997a).

Además 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 (Jurema y Nogueira, 2006). 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 (Rodríguez, 2001).

Con respecto a las células del cúmulo, todos los autores coinciden en que son necesarias a lo largo del proceso de MIV de los ovocitos para una adecuada maduración citoplasmática y con ello favorecer la posterior formación del PNM (Funahashi y Day, 1997) sin embargo, no parece ocurrir lo mismo con los estudios en FIV. Aunque en condiciones *in vivo* los ovocitos porcinos entran en el oviducto y son fecundados rodeados por sus células del cúmulo, actualmente existe una controversia sobre el empleo para FIV de ovocitos desnudos o rodeados por una parte de sus células del cúmulo debido a los resultados contradictorios alcanzados por los distintos autores (Chiuchi *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994; Ka *et al.*, 1997; Campos *et al.*, 2001).

2.2.4 Fertilización *in vitro*.

La FIV es una técnica fundamental para la reproducción asistida de mamíferos, la cual está 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 (Muñoz, 2005).

Las investigaciones sobre FIV se iniciaron al final de la década de 1950, cuando se produjo el nacimiento de conejos por esta técnica. Aunque la FIV progresó rápidamente en especies de mamíferos de laboratorio, su desarrollo fue más lento

en las especies domésticas, ya que el nacimiento de la primera ternera mediante FIV se logró en 1982. Estos veinte años de retraso fueron consecuencia de problemas metodológicos, ya que las condiciones requeridas para la capacitación espermática, la MIV de ovocitos y el desarrollo embrionario pre implantación, difieren entre las diversas especies de mamíferos (Ducolomb *et al.*, 2005).

Un espermatozoide para poder fertilizar, debe estar vivo, ser móvil y tener una morfología razonablemente normal (Saacke, 2003). El éxito en la FIV de ovocitos madurados *in vitro* se ha realizado mediante el uso de varios tipos de medios de fertilización en relación con el uso de semen fresco o congelado. En el caso de porcinos, el semen fresco es todavía la principal fuente de espermatozoides para realizar estudios de FIV, debido a que en muchos laboratorios, la crioconservación exitosa del semen aun es compleja y pasa por diversas dificultades (Abeydeera, 2002, Ducolomb *et al.*, 2009).

Una vez que los COCs han madurado y los espermatozoides han sido capacitados *in vitro*, se hace la fertilización, para que ocurra la penetración de estos espermatozoides en los ovocitos madurados (García, 2005), para concluir este proceso ambos gametos deben ser cocultivados por unas 6 h (Abeydeera y Day, 1997a).

2.2.5 Desarrollo de embriones.

Los primeros intentos de cultivar embriones porcinos para su desarrollo *in vitro* fueron desalentadores al comprobar la existencia de un bloqueo en el estadio de 4 células. Este estadio es el más sensible y difícil de sobrepasar bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, en la última década se han formulado diferentes medios (Cuadro 1) que permiten el desarrollo embrionario *in vitro* desde el estadio de una a 2 células hasta el estadio de blastocisto, tanto de embriones producidos *in vivo* como de embriones producidos a partir de ovocitos madurados y fecundados *in vitro* (Petters y Wells, 1993). La adición de aminoácidos como la glutamina, la cual supone una fuente de energía, la taurina o la hipotaurina (Petter y Reed, 1991; Reed y *et al.*, 1992) o el sorbitol como sustituto de éstas (NCSU-37; Petters y

Wells, 1993) ha mejorado sustancialmente el desarrollo *in vitro* de embriones porcinos. También es conocida la importancia de la adición de BSA a los medios de cultivo, como suplemento de proteína, para la producción de embriones *in vitro* (Wright 1977, Menino y Wright 1982; Youngs y McGinnis, 1990; Beckmann *et al.*, 1990; Bavister, 1995).

Sin embargo, la eficiencia en el desarrollo embrionario *in vitro* es aún muy baja, incluso con métodos mejorados que promueven la formación pronuclear y la penetración monospermica (Funahashi *et al.*, 1994a). Efectivamente, se ha comprobado que los embriones producidos *in vitro* y transferidos, 6 h después de la FIV, a oviductos de las receptoras para su cultivo durante 5 días, presentan un mayor número de núcleos en su masa celular interna (más de 100 núcleos) (Funahashi *et al.*, 1994b) que cuando los embriones fueron desarrollados *in vitro* durante dicho periodo (Funahashi *et al.*, 1994b). Desde hace algunos años, se intentan mejorar las condiciones de desarrollo *in vitro* mediante la adición de diferentes sustancias así como la sustitución de algunos medios por otros durante el cultivo. De esta manera, se ha comprobado que reemplazar BSA por FCS en el medio BECM-3 el día 5 de cultivo (Dobrinsky *et al.*, 1996) o transferir embriones procedentes del medio CZB al medio esencial mínimo de Eagle modificado, conteniendo un 20% de FCS (Pollard *et al.*, 1995), mejora la incidencia de blastocistos eclosionados e incrementa su número de células.

Cuadro 1. Medios usados para el desarrollo *in vitro* de embriones porcinos (Gil, 2001).

MEDIOS	AUTORES
Whitten´s ¹	Whitten y Biggers (1968)
BMOC.2 ²	Brinster (1969)
MKRB ³	Davis y Day (1978)
NCSU-6 ⁴	Petters <i>et al.</i> , (1990)
CZB ⁵	Chatot <i>et al.</i> , (1989); Misener <i>et al.</i> , (1991)
TLH ⁶	Hagen <i>et al.</i> , (1991)
NCSU-37	Petters (1992)
NCSU-23	Petters y Red (1991); Petters (1992)
ISU ⁷	Youngs <i>et al.</i> , (1993)
BECM-3 ⁸	Dobrinsky <i>et al.</i> , (1996)

1: Modificado posteriormente por Wright, (1977); Beckmann y Day (1993); French *et al.*, (1993); Youngs y McGinnis (1990); Youngs *et al.*, (1993). 2: Brinster Modified Oocyte Culture Medium 3: Krebs Ringer Bicarbonate. 4: North Carolina State University. 5: Chalot-Ziomek-Bavister. 6: Tyrode's Hepes. 7: Iowa State University. 8: Beltsville Embryo Culture Medium.

2.3 Quitosán.

2.3.1 Generalidades de la Quitina y obtención de Quitosán.

La Quitina es un polisacárido que se encuentra principalmente en las conchas de crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos, así como también en las paredes celulares de muchos hongos, bacterias, levaduras y algas (Laréz, 2003). Por su amplia distribución en la naturaleza, la Quitina, descubierta por Braconnot en 1811, es el segundo polisacárido en abundancia, después de la celulosa. Posteriormente Odier en 1823 (Khoushab y Yamabhai, 2010), reportó haber encontrado la misma sustancia en la estructura en algunos insectos y plantas, llamándola “Quitina” (Khoushab y Yamabhai, 2010).

La Quitina al igual que la celulosa, es un polisacárido no ramificado de glucosa, que se diferencia de la celulosa en el carbono C-2 por tener un residuo acetamido en lugar de un grupo hidroxilo. El Quitosán es un derivado de la Quitina, el cual es un polímero de acetil glucosamina (Figura 1) obtenido después de una desacetilación alcalina parcial de la Quitina, compuesto de copolímeros de glucosamina y N-acetil glucosamina y que abarca una serie de polímeros que pueden variar en peso molecular (Senel y McClure, 2004).

El Quitosán fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar Quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtenía un producto soluble en ácidos orgánicos (Laréz, 2003).

La Quitina y el Quitosán son polímeros lineales de N-acetil glucosamina (GlcNAc) y N-glucosamina (GlcN) enlazados por uniones beta-(1-4), que produce una estructura rígida no ramificada. La Quitina se compone de unidades acetilados predominantemente, mientras que en el Quitosán predominan las unidades desacetilados. Por otra parte la distribución del peso molecular, y el patrón de N-acetilación se utilizan para describir la estructura de estos polímeros (Mourya *et al.*, 2011). La diferencia en las propiedades de estos materiales puede llegar a ser notable, como por ejemplo la distinta solubilidad en medio acuoso que pueden

llegar a tener (Laréz, 2003). Comercialmente, la Quitina y el Quitosán se obtienen de fuentes de mariscos como cangrejos y camarón (Khor y Lim, 2003).

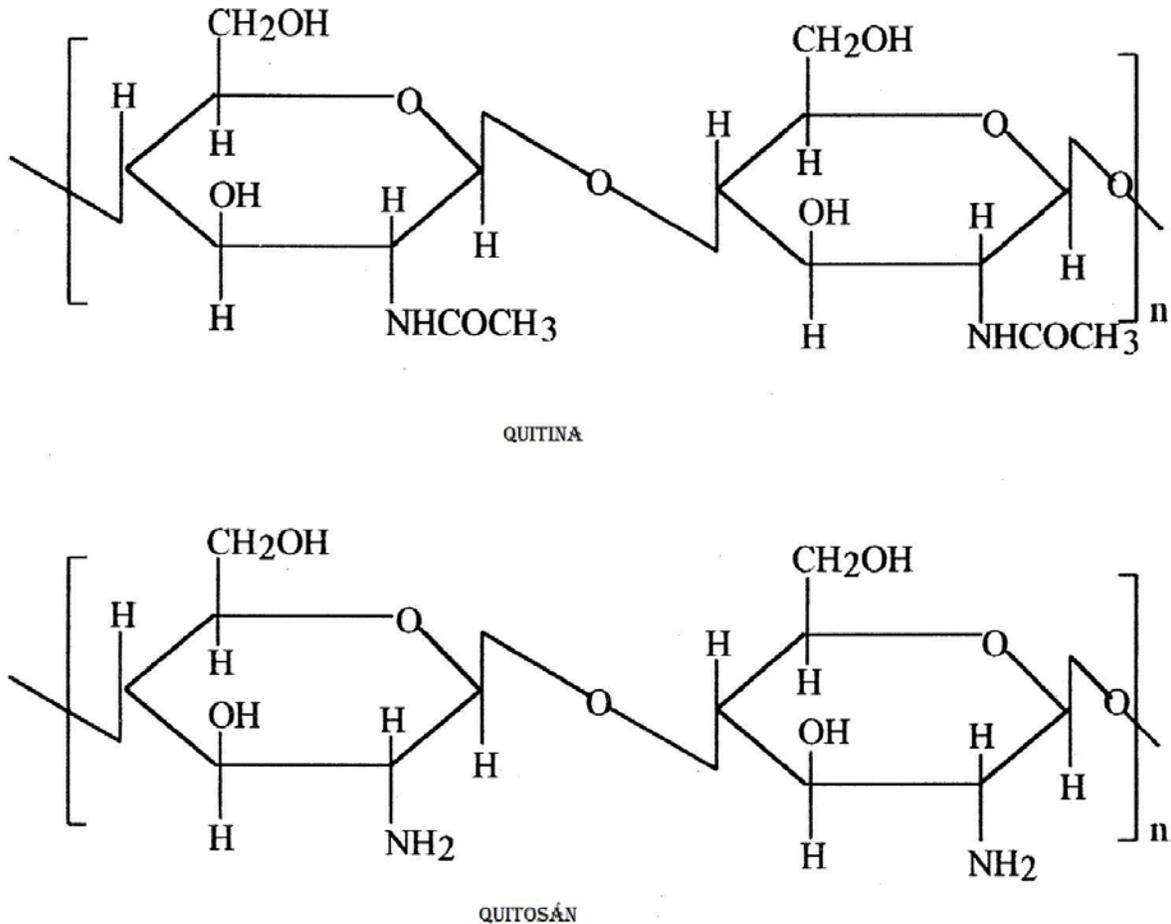


Figura 1. Estructura química de la quitina y del Quitosán. Arriba estructura de la quitina, abajo estructura del Quitosán (Majeti, 2000).

La historia de la Quitina y sus derivados como aceleradores de la cicatrización de heridas comenzó con los estudios de Prudden *et al.*, (1957), quienes notaron que el cartílago de tiburón había acelerado la curación de heridas y sugiriendo la glucosamina, que es un componente de cartílago de tiburón, que funcionó como un acelerador de la curación. Por lo tanto, identificaron el GlcNAc, derivado de la glucosamina, como un acelerador de la cicatrización de heridas. El Quitosán actúa como acelerador de la cicatrización de heridas interviniendo en la formación de nuevo tejido (conocido como granulación), el cual se debe formar antes de que el

epitelio crezca sobre una herida y actualmente ya es utilizado en medicina veterinaria (Ueno *et al.*, 2001).

2.3.2 Aplicaciones del Quitosán.

El Quitosán posee una gran cantidad propiedades que lo hacen muy valioso en el campo de la biomedicina, por lo cual los investigadores le han dado gran cantidad de usos, algunos de ellos son:

- Cicatrización de heridas. Estos polímeros y sus productos aceleran la cicatrización de heridas, reducen la frecuencia de tratamiento, y dan protección y disminuyen el dolor en heridas superficiales. Además de acelerar la curación de heridas, el Quitosán es también capaz de activar las defensas del huésped para prevenir la infección, lo que ofrece una alternativa al uso de antibióticos (Senel y McClure, 2004).
- Actividad antimicrobiana. Se ha demostrado que el Quitosán proporciona inhibición de la proliferación bacteriana en el tratamiento de heridas infectadas. La actividad antimicrobiana de Quitosán se ha reconocido contra varias bacterias y hongos, y está influenciada por una serie de factores que incluyen el tipo de Quitosán, el grado de polimerización y sus otras propiedades (Mi *et al.*, 2003). El mecanismo exacto por el cual Quitosán ejerce su actividad antimicrobiana es actualmente desconocido, se ha sugerido que la naturaleza policatiónica de este biopolímero, la cual se forma a partir de soluciones ácidas por debajo de pH 6.5, es un factor importante en su actividad contra algunos microorganismos. Por lo tanto, se ha propuesto que los grupos amino cargados positivamente de las unidades de glucosamina interactúan con componentes cargados negativamente en las membranas celulares microbianas, alterando sus propiedades de barrera, y evitando de este modo la entrada de nutrientes o causando la fuga de los contenidos intracelulares. Otro mecanismo propuesto implica la penetración de Quitosán de bajo peso molecular en la célula, la unión a ADN y la posterior inhibición de la síntesis de ARN y proteínas. Se ha

demostrado que el Quitosán activa varios procesos de defensa en los tejidos vegetales e inhibe la producción de toxinas así como el crecimiento microbiano debido a su capacidad de quelar iones metálicos (Miranda y Lizárraga, 2012).

- Regeneración de tejidos. Una de las características más prometedoras del Quitosán es su excelente capacidad para ser procesada en estructuras porosas para su uso en el trasplante de células y regeneración de tejidos porosos. Las propiedades mecánicas de andamios de Quitosán dependen en gran medida los tamaños del poro y orientaciones de los poros (Khor y Lim, 2003).
- Analgesia. El principal efecto analgésico del Quitosán se debe a la absorción de protones liberados en el lugar de la inflamación, mientras que el efecto de la Quitina se debe a la absorción de la bradícina. El Quitosán y Quitosán N-O-carboximetil incorporado con la morfina se han utilizado para desarrollar un producto que proporcione de 8 a 12 h de analgesia eficaz y que es barato, no irritante en el sitio de inyección y sin efectos secundarios distintos a los normalmente asociados a la morfina (Khoushab y Yamabhai, 2010).

2.3.3 Quito oligómeros.

Las tendencias recientes en el campo de la investigación sobre la Quitina se han centrado en los oligosacáridos, que son más solubles y tienen varios efectos biológicos atractivos. N-acetil-quito oligosacárido y quito oligosacárido (COS) se originó a partir de la Quitina y el Quitosán, respectivamente. Los oligómeros de Quitina y Quitosán pueden obtenerse tanto química y enzimáticamente (Khoushab y Yamabhai, 2012).

2.3.4 Propiedades de los quito oligómeros.

Se ha demostrado que los quito oligosacáridos aceleran los efectos curativos del alcohol polivinílico en heridas (PVA) si se utiliza en las etapas iniciales del proceso

de curación. Se ha demostrado que los quitooligosacáridos pueden inhibir el crecimiento de *Actinobacillus*, lo que indica que tiene actividad antimicrobiana (Choi *et al.*, 2001), así como efectos inhibitorios sobre el crecimiento de tumores y la metástasis del cáncer de pulmón en ratones (Shen *et al.*, 2009). También pueden inducir la producción de interleucinas 1 y 2, y en consecuencia, contribuir a mejorar la función de los macrófagos, asesinos naturales, células T citotóxicas y leucocitos polimorfonucleares, en los mecanismos de defensa. La actividad anti-metastásica de acetilquitohexosa contra el carcinoma pulmonar de Lewis en ratones (Khoushab y Yamabhai, 2010).

2.3.5 Propiedades biológicas.

El Quitosán es insoluble a un pH neutro y alcalino, forma sales solubles en agua con ácidos inorgánicos y orgánicos, incluyendo, ácidos clorhídrico, glutámico, láctico y acético. Recientemente, se ha dado gran importancia a los derivados del Quitosán con un grado de desacetilación definido y despolimerización debido a sus propiedades fisicoquímicas significativamente diferentes. El grado de acetilación representa la proporción de unidades N-acetil-D-Glucosamina con respecto al número total de unidades. Las propiedades del Quitosán (por ejemplo pKa y solubilidad) pueden ser modificadas cambiando sus propiedades como el grado de desacetilación y formulación tales como el pH y fuerza iónica. A pH neutro, la mayoría de las moléculas de Quitosán pierden su carga y el precipitado de la solución (Senel y McClure, 2004).

La Quitina y el Quitosán están dotados de actividad bioquímica, excelente biocompatibilidad, y completa biodegradabilidad, en combinación con una baja toxicidad. La gran cantidad de conocimientos relacionados con la Quitina se extiende más allá de las fronteras de los clásicos campos de la ciencia, e incluye la ecología, microbiología, zoología, entomología, enzimología, por mencionar sólo algunas de las áreas disparejas, donde la Quitina juega un papel importante (Muzzarelli y Muzzarelli, 2005).

3 JUSTIFICACIÓN.

El uso de embriones porcinos para la investigación ha aumentado drásticamente, en sustitución de los roedores, como animal “modelo” por su mayor tamaño (Wall *et al.*, 1997) y sus características fisiológicas más cercanas a la especie humana. Actualmente se utilizan para realizar distintos programas de tecnología transgénica, además de buscar el mejoramiento genético y la recuperación de cerdos con características especiales.

Sin embargo, a pesar de las expectativas en el campo de biomedicina, la obtención *in vitro* de embriones porcinos hoy en día cuenta con algunas limitaciones y un resultado final de la técnica entre el 30-40% de blastocistos (Muñoz, 2005).

La eficiente producción *in vitro* de embriones porcinos normales nos permitiría obtener no sólo material para aplicaciones genéticas, sino también descubrir información sobre los mecanismos básicos de la fertilización y el desarrollo embrionario. En la especie porcina, la polispermia es uno de los mayores problemas asociados a la FIV (Funahashi y Day, 1997) ya que supone una condición letal en los embriones de mamíferos (Biswas, 2011), aunque los intentos que se han realizado para superar este problema han sido y continúan siendo numerosos (Coy *et al.*, 1993; Niwa, 1993; Nagai, 1994; Funahashi y Day, 1997; Funahashi y Nagai, 2001).

El desajuste entre las condiciones *in vivo* contra *in vitro* sugiere la necesidad de realizar nuevos estudios en el ámbito de medios de cultivo, estudiando la posibilidad de formular nuevos medios para FIV o bien adecuando los ya existentes, adicionándoles suplementos químicamente definidos que puedan favorecer los resultados obtenidos (Romar *et al.*, 2001).

Otro enfoque alternativo para la promoción del sistema de PIV es establecer un sistema de cultivo utilizando sólo medios químicamente definidos. Un medio químicamente definido elimina factores desconocidos presentes en los materiales

biológicos tales como suero o albúmina sérica, la aplicación de un medio químicamente definido para embriones PIV tiene grandes ventajas, especialmente para estudiar el mecanismo y el efecto de productos químicos en el cultivo embrionario (Dang-Nguyen *et al.*, 2011).

4 HIPÓTESIS

La adición de Qitosán a los medios de MIV y/o DIV mejorará la calidad de los ovocitos madurados *in vitro* y los embriones porcinos producidos *in vitro*.

5 OBJETIVOS.

Objetivo general.

Evaluar la calidad de ovocitos madurados *in vitro* y de los embriones porcinos producidos *in vitro* en medios de cultivo suplementados con Qitosán.

Objetivos específicos.

Evaluar el porcentaje de maduración de ovocitos cultivados en presencia de Qitosán.

Evaluar el desarrollo embrionario de ovocitos madurados *in vitro* en presencia de Qitosán en el medio de maduración.

Evaluar el desarrollo embrionario al agregar Qitosán en solución al medio de maduración y posteriormente al medio de desarrollo embrionario.

Evaluar el desarrollo embrionario al agregar Qitosán en solución al medio de desarrollo embrionario.

6 MATERIAL Y MÉTODOS.

Se realizaron 4 experimentos, todos bajo el mismo procedimiento de producción embrionaria, los ovocitos y cigotos se distribuyeron aleatoriamente en los diferentes grupos, con las diferentes concentraciones de Quitosán y los grupos testigo de cada experimento. A menos que se indique otra marca, los reactivos utilizados en este trabajo fueron de la marca Sigma-Chemical Co (St. Louis, MO, EUA).

El Quitosán comercial utilizado es un quitoooligosacárido de bajo peso molecular (3.5 kilodaltons) (FACOS[®], Kitto Life, Seúl, Corea). Se preparó una solución stock de Quitosán 1:200 en medio de MIV y otra solución stock de Quitosán 1:200 en medio de DIV, de las cuales se tomó la cantidad necesaria para agregarla al medio de MIV y DIV respectivamente y obtener las concentraciones finales de 35, 50, 100 y 150 ppm para cada grupo en según el experimento realizado.

Experimento 1. Evaluación del efecto del Quitosán (35 ppm) en el medio de maduración en la MIV.

Se seleccionaron los COCs que presentaban buena calidad, es decir que estuvieran rodeados por varias capas de células de la granulosa y con un citoplasma de aspecto homogéneo. Los COCs obtenidos se cultivaron en medio de MIV (Cuadro B) distribuidos en 2 diferentes grupos: Grupo 1 o testigo, sin la presencia de Quitosán, y Grupo 2, COCs tratados con 35 ppm (35 µg/ml) de Quitosán, con la finalidad de evaluar la maduración de los mismos.

Experimento 2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de Quitosán, en el medio de maduración, en la MIV y en el desarrollo embrionario.

Para verificar que el resultado en el experimento anterior se debía al efecto del Quitosán se decidió incrementar las concentraciones del Quitosán en el medio de MIV, empleando las concentraciones finales de 50 ppm (50 µg/ml), 100 ppm (100 µg/ml) y 150 ppm (150 µg/ml).

En la primera etapa, después de incubar los COCs durante 44 h (Ducolomb *et al.*, 2005) en medio de maduración, el 50% de los ovocitos se utilizaron para valorar la maduración, mediante la fijación y posterior tinción con aceto-orceína como se mencionó anteriormente.

El otro 50% de los ovocitos se fertilizaron para evaluar su desarrollo después de 168 h de incubación post fertilización.

Experimento 3. Evaluación del efecto diferentes concentraciones (50, 100 150 ppm) de Quitosán en el medio de DIV sobre el desarrollo embrionario.

Para este experimento los 739 cigotos obtenidos del experimento 2, fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos con las diferentes concentraciones de Quitosán: Grupo 1 o testigo, los cigotos fueron cultivados en medio NCSU-23 sin la adición de Quitosán; Grupo 2, suplementado con 50 ppm de Quitosán, Grupo 3, los cigotos fueron cultivados en medio DIV en presencia de Quitosán a 100 ppm; y Grupo 4, con adición de Quitosán al medio de DIV a una concentración de 150 ppm.

Para realizar la evaluación del desarrollo embrionario a los 7 días desde el comienzo de la FIV, se utilizó un microscopio invertido (Leica DMIL LED, Alemania) con el cual se clasificaron los embriones según su grado de desarrollo.

Experimento 4. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de Quitosán en el medio de MIV y en el de DIV sobre el desarrollo embrionario.

Durante este experimento, los cigotos fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos: Grupo 1 o testigo, no se agregó Quitosán ni en el medio de MIV ni en el de DIV; Grupo 2, se adicionó Quitosán en el medio de MIV a 50 ppm y al cambiarlos al medio de DIV también se les agregó 50 ppm de Quitosán; Grupo 3, Los presuntos COCs fueron cultivados con 100 ppm de Quitosán en medio de MIV y posteriormente los presuntos cigotos se cultivaron en medio de DIV con 100 ppm de Quitosán; Grupo 4, a este grupo se le agregaron 150 ppm tanto en medio de MIV como en el de DIV.

6.1 Recolección de Ovarios.

Los ovarios se obtuvieron de cerdas púberes con un peso promedio de 90 a 100 kg, sacrificadas en el rastro TIF PIGAMEX, ubicado en Tepatitlán, Jalisco. De donde fueron transportados al laboratorio acuático-pecuario del Centro Nacional de Recursos Genéticos, en una solución de NaCl 0.157 M a una temperatura entre 25 y 28°C (Ducolomb *et al.*, 2005), en un tiempo máximo de 2 h (Abeydeera, 2002, Ducolomb *et al.*, 2009). Una vez en el laboratorio, los ovarios obtenidos se lavaron en dos ocasiones con solución salina para eliminar restos de sangre y suciedad y con ello disminuir los riesgos de contaminación.

6.2 Recuperación de ovocitos.

Para obtener los COCs se aspiraron de los ovarios obtenidos, folículos de 3 a 6 mm con una jeringa de 10 ml y una aguja hipodérmica calibre 18, por medio de vacío. El líquido folicular fue recogido en un tubo cónico de 50 ml (Nunc, USA) dejándolo sedimentar por 20 min. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en dos ocasiones con medio de Tyrode modificado suplementado con lactato de sodio a 10 mM, HEPES 10 mM y de alcohol polivinílico al 0.1% (TL-HEPES-PVA) a un pH de 7.3 a 7.4 (Wang *et al.*, 1995). El sedimento resultante se

vació en una caixa de petri de 100 x 15 (Nunc, USA) con 10 ml de medio TL-HEPES-PVA para realizar la búsqueda de los COCs en un microscopio estereoscópico a 25x (Leica M50, Alemania).

6.3 Selección de complejos ovocito-células del cúmulo.

Los criterios de selección de los COCs fueron los descritos por Sánchez y Silva (2003), bajo el microscopio estereoscópico a un aumento de 25x, y clasificados como aptos (categorías I y II) o no aptos (categorías III y IV) para la MIV. Esto con base en las características de las células del cúmulo, de la corona radiada y en la homogeneidad del citoplasma del ovocito (Mattioli *et al.*, 1991).

- COCs categoría I (Excelentes). Los ovocitos presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 ó más capas compactas del cúmulo.
- COCs categoría II (Buenos). Los ovocitos presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa, pero menos de 5 capas del cúmulo.
- COCs categoría III (Regulares). Los ovocitos presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del cúmulo presentes son menos compactas.
- COCs categoría IV (Malos). Los ovocitos presentan citoplasma no homogéneo o muy fragmentado y las células de la corona y del cúmulo se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad.

6.4 Maduración de COCs.

Una vez seleccionados los COCs, fueron lavados tres veces en gotas de 500 µl de medio de maduración TCM-199 con sales de Earle, L-glutamina y bicarbonato de sodio (IN VITRO, México), suplementado con D-glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, PVA 0.1%, cisteína 0.57 mM y EGF 10 ng/ml. Se colocaron 50 COCs en cada pozo de una placa de cuatro pozos (Nunc, USA), en 500 µl de medio de maduración suplementado con 0.5 mg/ml de LH y 0.5 mg/ml FSH

(Abeydeera *et al.*, 1998ab), los pozos fueron cubiertos con aceite mineral (Fisher Scientific, USA.) y se colocaron en la incubadora (Binder, Alemania) durante 44 h (Wang *et al.*, 1995).

Transcurrido el tiempo de cultivo, 20% de los COCs fueron fijados y teñidos para evaluar la maduración y el resto fueron destinados para la fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*.

6.5 Fertilización *in vitro*.

Para realizar la FIV se utilizó el medio amortiguador Tris modificado (mTBM) que consta de NaCl 113.1 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 2H₂O 7.5 mM, Tris 20 mM, glucosa 11 mM y piruvato de sodio 5 mM, suplementado con BSA 0.4% y cafeína 2.5 mM (Abeydeera *et al.*, 1998).

Después de la MIV, se realizó la FIV según lo descrito por Abeydeera *et al.* (1998ab) con modificaciones. La preparación de los COCs para realizar la técnica de FIV, fue mediante la denudación de los mismos mediante un vortex (Genie 2, USA) para eliminar las células del cúmulo. Los ovocitos desnudos se lavaron dos veces en gotas de 500 µl de medio de maduración y tres veces en gotas 500µl de FIV. Posteriormente se colocaron 30 ovocitos en micro gotas de 50 µl de mTBM cubiertas con aceite mineral en cajas de petri de 35 x 10 (Nunc, USA) y se incubaron a 39 °C con 5% de CO₂ en aire y humedad a saturación hasta el proceso de fertilización (Abeydeera *et al.*, 1998ab).

Para la fertilización se utilizó semen congelado, el cual se descongeló en agua a 37°C durante 30 seg, y para capacitar los espermatozoides se utilizó gradientes de Percoll al 90 y 45% (v/v), sobre el que se depositaron 500 µl de semen (Canovas, 2007), en un tubo cónico de 15 ml (Nunc, USA), el Percoll se equilibró previamente a una temperatura de 37°C; posteriormente se centrifugó a 2700 rpm por 20min (Thermo Scientific CL2, China); el sobrenadante se eliminó y el sedimento se diluyó con 4 ml de medio mTBM, centrifugándolo a 1700 rpm por 5 min. El pellet con el paquete celular obtenido se diluyó con medio de FIV para obtener una concentración de 5×10^5 espermatozoides por ml (Abeydeera *et al.*,

1998a). Una vez realizada la fertilización, las células se incubaron a 39°C con 5% CO₂ y humedad a saturación durante 6 h.

6.6 Desarrollo de Embriones

Transcurrido el tiempo de coincubación, los presuntos cigotos se lavaron tres veces en gotas de 50 µl de medio de desarrollo embrionario North Carolina State University-23 (NCSU-23) (Petters y Wells, 1993) suplementado con 0.4% de BSA libre de ácidos grasos para eliminar los espermatozoides, posteriormente se transfirieron a gotas de 500 µl de medio de desarrollo cubiertas con aceite mineral y se incubaron durante 168 h.

6.7 Evaluación de la Maduración

Se realizó una evaluación morfológica de ovocitos mediante observación de la expansión de las células de la granulosa y homogeneidad del citoplasma al microscopio invertido (Leica DMIL LED, Alemania) (Saavedra, 2009).

La maduración también fue evaluada mediante la técnica de aceto-orceína al 1% en ácido acético al 45%. Para esto se colocaron los ovocitos prensados entre un portaobjetos y un cubreobjetos para ser fijados en una solución de ácido acético glacial-etanol (J.T. Baker) (1:3) durante 72h. Posteriormente los ovocitos se tiñeron con una solución de orceína al 1% en ácido acético al 45%. Las laminillas se evaluaron con un microscopio óptico (Leica ICC50 HD, Alemania) a un aumento de 100 x. Aquellos ovocitos que mostraron vesícula germinal (VG) fueron considerados como inmaduros, los que se observaron en la primera Metafase (MI) se consideraron en proceso de maduración y los que se encontraban en la segunda Metafase (MII) y/o con un cuerpo polar se clasificaron como madurados (Ducolomb *et al.*, 2013).

6.8 Evaluación del Desarrollo Embrionario

La evaluación del desarrollo embrionario se realizó a las 168 h post fertilización, utilizando un microscopio invertido (Leica DMIL LED, Alemania) clasificando los embriones según su grado de desarrollo.

Los embriones fueron observados y clasificados de la siguiente forma: sin desarrollo, aquellos ovocitos no fertilizados, los de 2 a 16 blastómeros se conjuntaron en un sólo grupo y fueron considerados como embriones tempranos, aquellos con un número mayor de blastómeros fueron considerados como mórulas y los que tenían una cavidad o blastocele se consideraron como blastocistos. Todos fueron evaluados mediante observación en un microscopio invertido (Leica DMIL LED, Alemania) (Ducolomb *et al.*, 2009).

6.8.1 Clasificación embrionaria.

De acuerdo a la evaluación de su morfología, los embriones se clasificaron en cuatro grupos diferentes, dependiendo de la calidad de los mismos y de esta forma cada embrión recibe un número del 1 al 4, que indica su calidad (Dorn y Kraemer, 1987).

6.8.1.1 Clasificación según la calidad del embrión.

Calidad 1 = Excelente. El embrión es compacto (la masa celular debe ser mayor al 85%), esférico, color claro, desarrollo adecuado a su etapa de cultivo, pocas vesículas, sin desechos celulares ni blastómeros extruidos.

Calidad 2 = Bueno. El embrión es compacto o con una leve descompactación (por lo menos el 50% de las células deben estar intactas), poco irregular, color uniforme, desarrollo adecuado a su estado de cultivo, presencia de pocas vesículas y blastómeros extruidos, pocos desechos celulares.

Calidad 3 = Regular. Tienen una descompactación muy marcada (por lo menos el 25% de las células deben estar intactas), desechos celulares, color oscuro o con zonas claras y oscuras, vesículas, blastómeros extruidos y masa pequeña.

Calidad 4 = Malo o No Transferible. El embrión tiene una degeneración muy marcada, masa pequeña (menor al 25% de lo normal), color oscuro, descompactación, vesículas, irregularidades en los blastómeros (Dorn y Kraemer, 1987).

6.8.1.2 Clasificación de acuerdo a la etapa de desarrollo.

La clasificación de la etapa o estadio de desarrollo embrionario se determinó utilizando un microscopio invertido. Cada embrión recibió un número del 1 al 8, de acuerdo a su desarrollo individual, como se describe a continuación (Dorn y Kraemer, 1987, Stringfellow y Seidel, 1990):

- 1 = Ovulo;
- 2 = Embrión de 2 a 16 células;
- 3 = Mórula temprana;
- 4 = Mórula compacta;
- 5 = Blastocisto temprano;
- 6 = Blastocisto maduro;
- 7 = Blastocisto expandido;
- 8 = Blastocisto eclosionado.

6.9 Análisis Estadístico.

En el primer experimento se realizó la prueba estadística de Chi cuadrada para comparar la frecuencia de COCs maduros obtenida en cada grupo. Para comparar el efecto de las diferentes concentraciones de Qitosán en los experimentos 2, 3 y 4 se utilizó la prueba estadística de análisis de varianza para un factor. Ambas pruebas se aplicaron con un nivel de significancia $p < 0.05$. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico R versión 3.0.2 (R Core Team, 2013).

7 RESULTADOS.

Experimento 1. Evaluación del efecto del Quitosán (35 ppm) en el medio de maduración en la MIV.

En el Experimento 1 se utilizaron 704 COCs que se distribuyeron en dos grupos: medio de MIV (testigo) conformado por 345 COCs y medio de MIV con Quitosán a 35 ppm (experimental) en el que se utilizaron 359 COCs. Se observó que la presencia de Quitosán no incrementó significativamente la expansión de las células del cúmulo (87.42 %, 85.10 % respectivamente) (Figura 2).

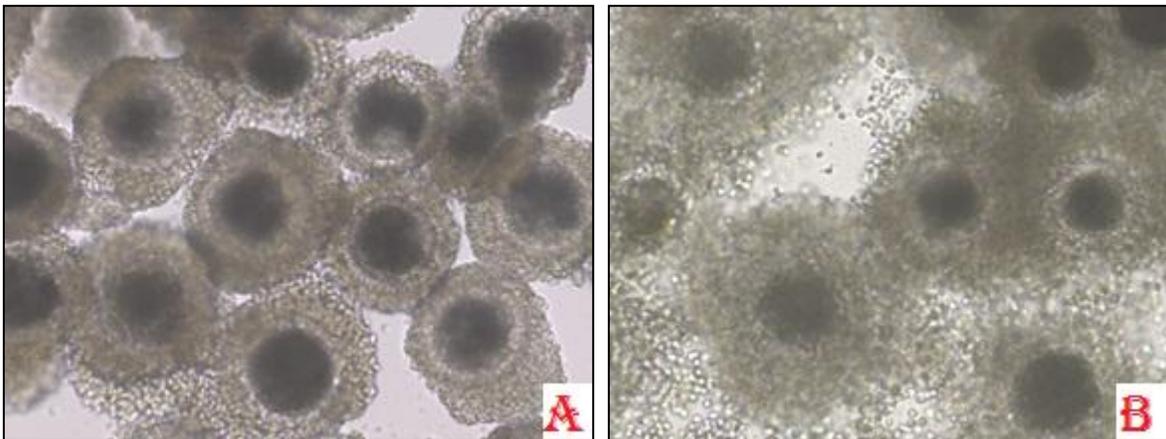


Figura 2. Imagen representativa de la evaluación morfológica de ovocitos observados al microscopio invertido (Leica DMIL, Alemania) A. ovocitos antes de ser madurados rodeados por varias capas de células de la granulosa, B. ovocitos con células de la granulosa expandidas.

En el caso de los porcentajes de maduración de ovocitos tratados con Quitosán (35 ppm) en medio de maduración TCM-199, al evaluarlos con la técnica de acetorceína (Figura 3), se observó que no se presentaron diferencias entre el grupo testigo y el grupo tratado ($p > 0.05$) en cuanto a los ovocitos que se encontraron en MII con la presencia del paquete cromosómico y cuerpo polar (Cuadro 2).

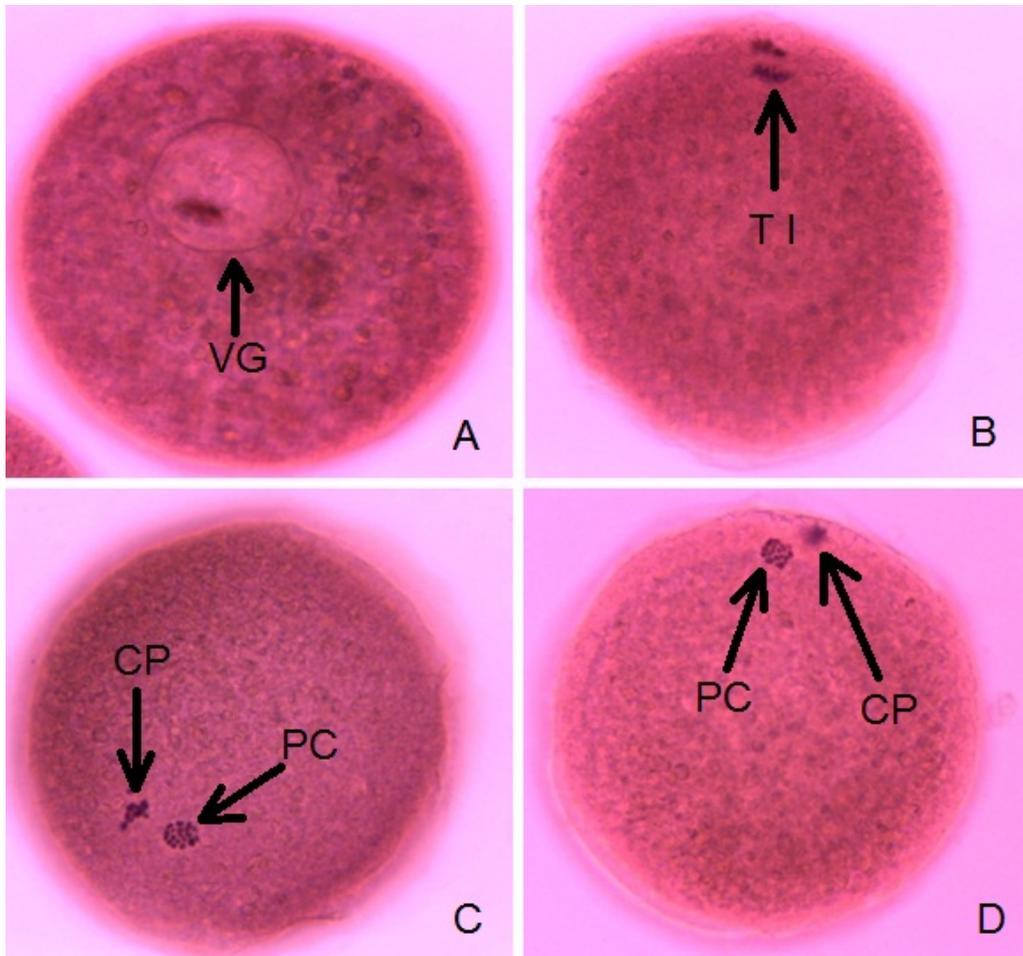


Figura 3. Ovocitos porcinos fijados en una solución ácido etanol-acético en proporción 3:1 y teñidos con la técnica de aceto-orceína al 1%, observados en microscopio óptico (Leica, ICC50 HD, Alemania) a 100x. A ovocito inmaduro con presencia de vesícula germinal (VG). B. ovocito en MI presenta paquete cromosómico en telofase I (T I). C y D ovocitos en MIII, las flechas indican el paquete cromosómico (PC) y cuerpo polar (CP).

Cuadro 2. Porcentajes de maduración de ovocitos porcinos tratados con Quitosán (35 ppm) en medio de maduración.

Tratamiento	Etapa de maduración		
	% (MII/n)	% (MI/n)	% (VG/n)
0 ppm	79.42 (274/345)	13.04 (45/345)	7.54 (26/345)
35 ppm	75.21 (270/359)	13.37 (48/359)	11.42 (41/359)

MII: ovocitos en Metafase II. MI: ovocitos en Metafase I. VG: ovocitos en etapa de Vesícula Germinal. N total de ovocitos cultivados.

Experimento 2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de Quitosán, en el medio de maduración, en la MIV y en el desarrollo embrionario.

En este experimento, a excepción del grupo tratado con la concentración de 100 ppm de Quitosán, todos los demás grupos mostraron un aumento significativo del porcentaje de ovocitos que llegaron a la MII ($p < 0.05$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentajes de maduración de ovocitos porcinos aplicando Quitosán en solución, en 4 concentraciones diferentes en el medio de maduración.

Tratamiento	Etapa de maduración		
	% (MII/n)	% (MI/n)	% (VG/n)
0 ppm	77.76 ^c (63/81)	7.41 ^b (6/81)	14.83 ^a (12/81)
50 ppm	87.39 ^a (76/87)	3.45 ^c (3/87)	9.16 ^{bc} (8/87)
100 ppm	77.76 ^c (63/81)	11.12 ^a (9/81)	11.12 ^b (9/81)
150 ppm	81.63 ^b (67/82)	11.02 ^a (6/82)	7.35 ^c (6/82)

MI: ovocitos en Metafase II. MI: ovocitos en Metafase I. VG: ovocitos en etapa de Vesícula Germinal. N total de ovocitos cultivados. Letras distintas en la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Para la siguiente etapa de este experimento, al evaluar el desarrollo embrionario, se observó que en el grupo testigo se presentó un mejor desarrollo embrionario, alcanzando un mayor porcentaje de embriones en etapa de mórula (44.95 %) en comparación con los grupos tratados. Por otra parte, el grupo con 150 ppm de Quitosán mostró una mayor proporción de embriones en etapa temprana, los cuales no se desarrollaron hasta la etapa de mórula, lo que sugiere un efecto inhibitorio al utilizar dicha concentración de Quitosán (Cuadro 4).

Cuadro 4. Embriones porcinos obtenidos al aplicar Quitosán en solución, en 4 concentraciones diferentes, al medio de maduración.

Desarrollo embrionario				
Tratamiento	% (2 a 4 células/n)	% (> de 6 células/n)	% (Mórulas/n)	% (Blastos/n)
0 ppm	25.67 (20/78)	16.62 ^b (13/78)	44.95 ^a (35/78)	12.76 (10/78)
50 ppm	25.71 (21/82)	20.71 ^{ab} (17/82)	40.22 ^b (33/82)	13.36 (11/82)
100 ppm	28.41 (23/81)	18.59 ^{ab} (15/81)	40.71 ^b (33/81)	12.30 (10/81)
150 ppm	28.56 (22/77)	22.10 ^a (17/77)	37.64 ^b (29/77)	11.69 (9/77)

Literales distintas en la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Experimento 3. Evaluación del efecto diferentes concentraciones (50, 100 150 ppm) de Quitosán en el medio de DIV sobre el desarrollo embrionario.

En el caso de la evaluación del Quitosán en el medio de DIV, y su efecto sobre el desarrollo de los embriones, se utilizaron 739 presuntos cigotos los cuales se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos. Para el caso del grupo testigo se utilizaron 180 cigotos, en los tratamintos con una concentración de 50, 100 y 150 ppm se observaron 189, 184 y 186 cigotos respectivamente. Se puede señalar que en el caso de este experimento, ninguna de las concentraciones de Quitosán

evaluadas tuvo efecto sobre el desarrollo de los embriones y la formación de blastocisto con respecto al grupo testigo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Embriones porcinos producidos a partir de embriones que se dividieron en medio NCSU-23 con la adición de Quitosán a 3 diferentes concentraciones y un testigo.

Tratamiento	Desarrollo embrionario			
	% (2 a 4 células/n)	% (> de 6 células/n)	% (Mórulas/n)	% (Blastos/n)
0 ppm	27.96 ^b (36/127)	14.02 ^a (18/127)	45.62 ^b (57/127)	12.39 (16/127)
50 ppm	28.31 ^a (38/135)	16.14 ^a (22/135)	43.06 ^{bc} (58/135)	12.47 (17/135)
100 ppm	34.98 ^b (46/133)	14.37 ^a (20/133)	38.54 ^c (51/133)	12.08 (16/133)
150 ppm	26.22 ^b (37/139)	7.92 ^b (11/139)	54.35 ^a (75/139)	11.49 (16/139)

Literales distintas en la misma columna representan diferencias significativas (p< 0.05).

Experimento 4. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de Quitosán en el medio de MIV y en el de DIV sobre el desarrollo embrionario.

Durante este experimento se utilizaron 702 presuntos cigotos, los cuales fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos. En el grupo testigo se utilizaron 174 cigotos cultivados sin adición de Quitosán, para el resto de los grupos tratados con concentraciones de 50, 100 y 150 ppm de Quitosán, se utilizaron 176, 178 y 174 cigotos respectivamente. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en el Cuadro 6, donde se puede observar que en cuanto al desarrollo

embrionario ninguna de las concentraciones de Quitosán probadas mostró diferencia, con respecto al grupo testigo.

Cuadro 6. Producción de embriones porcinos desarrollados en medio NCSU-23, con la adición de Quitosán a 3 diferentes concentraciones más un testigo; previa maduración en medio TCM-199 al que también se agregó Quitosán en las 3 concentraciones y su testigo.

Tratamiento	Desarrollo embrionario			
	% (2 a 4 células/n)	% (> de 6 células/n)	% (Mórulas/n)	% (Blastos/n)
Testigo	23.13 ^a (32/138)	18.90 (26/138)	45.09 ^a (62/138)	12.86 (18/138)
50 ppm	25.20 ^a (32/129)	19.20 (25/129)	43.14 ^a (56/129)	12.44 (16/129)
100 ppm	33.04 ^b (41/124)	20.97 (26/124)	34.89 ^b (43/124)	11.07 (14/124)
150 ppm	26.49 ^a (36/134)	23.13 (31/134)	37.70 ^b (50/134)	12.65 (17/134)

Literales distintas en la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

8 DISCUSIÓN.

Algunos autores señalan que la utilización de medios definidos para la producción de embriones *in vitro*, puede favorecer en gran medida una producción idónea de embriones *in vitro*, misma que pueda ser igualada con los resultados que se obtienen *in vivo* (Gonzales-Figueroa y Gonzales-Molfino, 2005), y de esta manera disminuir los factores desconocidos que pudieran interferir en la regulación de algunos procesos (Abeydeera, 2002).

Esta necesidad por obtener medios adecuados para la PIV de embriones porcinos ha hecho que desde hace tiempo investigadores como Funahashi *et al.* (1996) así como investigaciones más recientes (Yoshioka *et al.*, 2008) busquen alternativas para suplementar los medios existentes o desarrollar medios nuevos que favorezcan la producción de embriones porcinos.

Yoshioka *et al.* (2002) reportan que es posible producir embriones porcinos en un medio químicamente definido ya que al probar un nuevo medio desarrollado por ellos al cual llaman PZM lograron obtener buenos resultados que no presentan diferencias entre los medios utilizados e incluso con resultados obtenidos *in vivo*, al transferir 99 embriones cultivados en medio PZM y 100 embriones obtenidos *in vivo* no encontraron diferencias significativas en el porcentaje de partos (83 % para ambos grupos).

En otro estudio realizado por Yoshioka *et al.* (2008), se reporta el uso de un sistema definido de producción *in vitro* de embriones porcinos utilizando solo un medio básico a lo largo de todo el proceso de producción *in vitro* tanto MIV, FIV, como DIV, al que solo se le van adicionando diferentes cantidades o tipos de suplemento, logrando obtener muy buenos resultados, hasta un 96% de ovocitos maduros y hasta 48% de blastocistos.

Nguyen y Nguyen (2010) reportan que el Quitosán tiene la capacidad de mejorar la proliferación de una línea celular de fibroblastos en un cultivo celular cuando se agrega en solución a 35 ppm. Debido a las características y propiedades que se le atribuyen a esta molécula se decidió probarla en los medios de producción *in vitro*

de embriones porcinos. El reporte anterior permite pensar en la posibilidad de que el Quitosán en solución adicionado en los medios de producción *in vitro* pueda ejercer una acción positiva sobre los ovocitos favoreciendo la obtención de un mayor porcentaje de MII.

En el presente estudio, en los resultados obtenidos en el primer experimento aplicando Quitosán a 35 ppm, se puede observar una menor proporción de ovocitos que alcanzaron la maduración en el grupo tratado con 35 ppm de Quitosán en comparación con el grupo testigo 75.21 y 79.42% respectivamente, lo cual es similar a lo reportado por Ducolomb *et al.* (2005) quienes obtuvieron 82% de ovocitos madurados y al 78% reportado por Yoshida *et al.* (1993), pero superior al reporte de Fernández *et al.* (2010) con 40% de ovocitos que alcanzaron la MII, bajo condiciones similares y mismos medios de PIV.

Para comparar si el efecto observado en esta investigación es a causa del Quitosán, se realizó el segundo experimento para probar el efecto sobre los ovocitos y los embriones tratando el medio de maduración con diferentes concentraciones de Quitosán. En la primera etapa en la que se evaluó el efecto del Quitosán a las concentraciones de 50, 100 y 150 ppm se obtuvo un 77.76% de ovocitos maduros en el grupo testigo, similar al 78% reportado por Yoshida *et al.* (1993), mientras que el grupo tratado con 50 ppm obtuvo 87.39%, lo cual es superior al reportado por Valdez (2007) quien obtuvo 83% de maduración y la concentración de 150 ppm en donde se muestran un 81.63% de maduración que es similar al reportado por Valdez (2007) utilizando los mismos medios y bajo condiciones similares. El aumento en la proporción de ovocitos maduros puede deberse a que la concentración de 50 ppm es adecuada para llevar a cabo la maduración, esto debido a la similitud que existe entre en Quitosán y el ácido hialurónico, este último compuesto se ha reportado que es secretado por las células del cúmulo (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1998) aunque el papel que ejerce sobre los ovocitos se desconoce. Lo anterior sugiere que el Quitosán administrado en concentraciones de 50 y 150 ppm tiene un efecto positivo sobre la maduración de ovocitos ya que se obtuvo un mayor porcentaje de ovocitos en MII.

En la segunda etapa del experimento 2, en la que se evaluó la producción de embriones utilizando los ovocitos que se habían madurado en la primera etapa adicionando Quitosán a 50, 100 y 150 ppm en el medio de maduración, se observó un 44%, 40%, 40% y 37% en la producción de mórulas en los grupos testigo, 50 ppm, 100 ppm y 150 ppm respectivamente, porcentajes mayores a los obtenidos por Fernández *et al.* (2012) quienes reportan un 35% y Martínez (2002) que reporta 32% de embriones en etapa de mórula.

En cuanto a los blastocistos obtenidos, se observó que en el grupo tratado con 50 ppm de Quitosán obtuvo el mayor porcentaje de embriones que alcanzaron su desarrollo hasta esta etapa, obteniendo un 13.36% el cual fue mayor que los del grupo testigo que presentaron un 12.76%, no obstante esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0.005$). Para el caso de este experimento, los porcentajes obtenidos son más elevados que los reportados por Fernández *et al.* (2010) quienes reportan un 11.8% de blastocistos, mientras que Ducolomb *et al.* (2005) reportan un porcentaje de 14%, o Yoshioka *et al.* (2008) quienes señalan hasta un 78% de blastocistos.

Estos resultados muestran que el Quitosán aplicado en el medio de MIV a una concentración de 50 ppm favoreció la maduración de los ovocitos al obtener un mayor porcentaje de ovocitos en MII y un ligero incremento de la proporción de embriones que llegan a etapa de blastocisto.

En el caso del experimento 3, en donde se aplicó Quitosán al medio de desarrollo prácticamente se presentó la misma proporción de embriones en etapa de blastocisto 12.39%, 12.47%, 12.08% y 11.49% para los grupos testigo, 50 ppm, 100 ppm y 150 ppm respectivamente, sin diferencias entre los grupos ($p < 0.05$). En cuanto a la proporción de mórulas obtenidas, el grupo tratado con 150 ppm de Quitosán, presentó un mayor porcentaje de mórulas (54.35%) con respecto al grupo testigo (45.62%), diferencia que fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En el experimento 4, al adicionar Quitosán tanto en el medio de MIV como en el medio de desarrollo se observó la misma tendencia que al aplicar Quitosán solo

en el medio de desarrollo, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los 4 grupos.

En general la adición de Quitosán en los medios de cultivo no mostraron ningún efecto sobre la producción de embriones, ya que no se presentó diferencia en cuanto a la proporción de embriones en las diferentes etapas de desarrollo obtenidas en los diferentes grupos, lo cual se puede atribuir a la composición del Quitosán el cual presenta similitud con la estructura de la glucosa, se ha reportado que la utilización de la glucosa aumenta por parte de los embriones conforme avanzan los procesos de desarrollo embrionario, mientras que los embriones en los primeros estadios, y antes de la activación genómica, utilizan preferentemente al piruvato, lactato y glutamina como fuentes de energía (Lane y Gardner 2000).

La PIV de embriones porcinos es un campo de estudio muy amplio, ya que autores como Yoshioka *et al.* (2008) reportan excelentes resultados en cuanto a maduración de hasta el 96%, con producciones de mórulas y blastocistos que alcanzan un 78% utilizando sistemas de producción químicamente definidos, abriendo la posibilidad de desarrollar medios de cultivo para obtener resultados que se equiparen a los que se obtienen *in vivo*. Sin embargo, en la producción embrionaria rutinaria no es posible obtener resultados tan elevados, sino que lo común es obtener porcentajes de maduración ligeramente superiores a 70% y la producción de blastocistos es de alrededor de 12% (Yvonne Ducolomb, UAM, Comunicación Personal, 2104), por lo que es necesario realizar más estudios en busca de compuestos que contribuyan a optimizar la producción de embriones *in vitro*.

9 CONCLUSIONES.

1.- El Quitosán a una concentración de 35 ppm no tuvo efecto sobre la maduración de los ovocitos.

2.- La concentración de 50 ppm mejoró significativamente ($p < 0.05$) la maduración de los ovocitos.

3.- La concentración de 150 ppm de Quitosán en el medio de DIV incrementó el porcentaje de mórulas.

4.- La aplicación de Quitosán tanto en el medio de MIV y posteriormente en el medio de DIV no tuvo efecto sobre el desarrollo embrionario.

5.- Este trabajo contribuye al desarrollo de los sistemas de producción de embriones *in vitro*, a fin de obtener resultados cada vez mejores.

10 PERSPECTIVAS.

Este es el primer trabajo sobre el uso de Quitosán en un sistema de producción *in vitro* de embriones porcinos, por lo que se desconocen los mecanismos de acción de este compuesto en la maduración del ovocito y en el desarrollo embrionario temprano. Por lo anterior, es necesario continuar realizando estudios de producción *in vitro* de embriones, con la finalidad de esclarecer los mecanismos sobre los cuales el Quitosán puede tener un efecto benéfico, ya sea a nivel celular, molecular o ambos.

De llegarse a realizar nuevas investigaciones sería recomendable utilizar una tinción específica para cuantificar la cantidad de células que forman cada embrión, y con ello hacer un comparativo entre los grupos tratados con y sin Quitosán, para verificar si esta molécula tiene un efecto positivo sobre la multiplicación celular.

En este estudio se aplicó el Quitosán en el medio de MIV y en el medio de DIV al inicio de la incubación lo cual supone la posibilidad y necesidad de realizar más estudios utilizando el Quitosán a diferentes intervalos de tiempo durante cada incubación, por ejemplo 24 h después de iniciada la maduración en el caso del medio de MIV, y en el caso del medio de DIV podría ser a las 48 h de iniciada la incubación de los cigotos, todo esto para determinar si hay algún momento en el que el Quitosán favorezca en mayor medida la producción de embriones en comparación de los resultados obtenidos en este estudio.

De esta manera se podrían mejorar los porcentajes de producción de embriones *in vitro* y de obtener embriones de mejor calidad.

11 REFERENCIAS.

1. Abeydeera L, Day B. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen – thawed ejaculated spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1997a; 57: 729-734.
2. Abeydeera L y Day B. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Trisbuffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 1997b; 48: 537- 544.
3. Abeydeera L, Wang W, Pather R, Day B. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: Fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biology of Reproduction* 1998a; 58 1316-1320.
4. Abeydeera L, Wang W, Cantley T, Reike A, Prather R, Day B. Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Molecular Reproduction Development* 1998b; 51:395-401
5. Abeydeera L, Wang W, Cantley T, Rieke A, Murphy C, Prather R, Day B.. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 2000; 54: 787-797.
6. Abeydeera L. *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology* 2002; 57: 257-273.
7. Anguita B, Jiménez-Macedo AR, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. *Theriogenology* 2007; 67: 526-536.

8. Avila A, Costamagna V, Barrientos E, Pucci, Sánchez E, Strumia M. Películas de quitosano con sorbato de potasio unido física y covalentemente. Estudios de aplicación. Revista Iberoamericana de polímeros 2010; 11 (2): 73-87.
9. Bavister B. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Human Reproduction Update 1995; 1: 91-148.
10. Beckmann L, Cantley T, Rieke A, DAY B. Development and viability of one and two-cell porcine embryos cultured through the four-cell block. Theriogenology 1990; 33: 193.
11. Beckmann L, Day B. Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early-stage porcine embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium. Theriogenology 1993; 39: 611-622.
12. Bjerregaard B, Wrenzycki C, Philimonenko VV, Hozac P, Laurincik J, Niemann H, Motlik J, Maddox-Hyttel P. Regulation of ribosomal RNA synthesis during the final phase of porcine oocyte growth. Biology of Reproduction. 2004; 70: 925-935.
13. Biswas D, Hyun S. Supplementation with vascular endothelial growth factor during *in vitro* maturation of porcine cumulus oocyte complex and subsequent developmental competence after *in vitro* fertilization. Theriogenology 2011; 76: 153-160.
14. Bobadilla E, Espinoza A, Martínez E. Dinámica de la producción porcina en México de 1980 a 2008. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias 2010; 1(3): 251-268.
15. Campos I, Coy P, Romar R, Ruiz S, Gadea J. Effects of maturational stage, cummulus cells and coincubation of mature and immature cumulus-oocyte complexes on *in vitro* penetrability of porcine oocytes. Theriogenology 2001; 55:1489-1500.

16. Cánovas B. Interacciones homólogas y heterólogas *in vitro* de gametos porcinos, bovinos y humanos, y sus aplicaciones en el estudio de la fecundación. Universidad de Murcia, Departamento de Fisiología, 2007.
17. Casas, E. Bonilla E, Ducolomb Y, Betancourt M. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Toxicology in vitro* 2010; 24:224-230.
18. Chatot C, Ziomek C, Bavister B, Lewis J, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *Journal Reproduction and Fertility* 1989; 86: 679-688.
19. Choi B, Kim K, Yoo, Y, Oh S, Choi J, Kim C. *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001; 18: 553–557.
20. Coy P, Martínez E, Ruiz S, Vázquez JM, Roca J, Matas C. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pigs. *Theriogenology* 1993; 40:539-546.
21. Coy P, Romar R. *In vitro* production of pig embryos: a point of view. *Reproduction, Fertility and Development* 2002; 14:275-286.
22. Cran DG, Cheng WTK. The cortical reaction in pig oocytes during *in vivo* and *in vitro* fertilization. *Gamete Research* 1986; 13:241-251.
23. Dang-Nguyen T, Somfai T, Haraguchi S, Kikuchi K, Tajima A, Kanai Y, Nagai T. *In vitro* production of porcine embryos: current status, future perspectives and alternative applications. *Animal Science Journal* 2011; 82 (3): 374-382.

24. Dobrinsky J, Johnson L, Rath D. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biology of Reproduction* 1996; 55:1069-1074.
25. Dorn CG, Kraemer DC. Bovine embryo grading. Texas A&M University, College of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Physiology and Pharmacology, College Station, Texas 1987.
26. Ducolomb Y, Romo S, Balcázar J, Rodarte LF, Casas E, Fragoso GC, Sciutto EL, Betancourt M. Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos *in vitro*. *Técnica Pecuaria en México*, 2005; 43 (3): 425-432.
27. Ducolomb Y, Casas E, Valdez A, González G, Altamirano-Lozano M, Betancourt M. *In vitro* effect of Malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine *Cell Biology and Toxicology*. 2009 Dec; 25 (6): 623-33.
28. Ducolomb Y, González-Márquez H, Fierro R, Jiménez I, Casas E, Flores D, Bonilla E, Salazar Z, Betancourt M. Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 2013; Apr 1; 79 (6): 896-904.
29. Duque P, Hidalgo C, Gómez E, Pintado B, Facal N, Diez C. Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine *in vitro* embryo development and quality. *Reproduction Nutrition Development* 2003; 43: 487-496.
30. Fan H, Sun Q. Involvement of mitogen activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction* 2004; 70: 535-547.

31. Fernández F, Hernández J, Rosales MR. Efecto de la adición de FSH y LH en el medio sobre la maduración y el desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos de cerda. *Revista de Salud Animal* 2009; 31 (2): 122-128.
32. Fernández F, Hernández J, Reyes M. Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. *Revista de Salud Animal* 2010; 32 (2): 78-83.
33. Fernández F, Hernández J, Castellanos G. Viabilidad de ovocitos porcinos inmaduros y madurados *in vitro* vitrificados con etilén glicol y trehalosa. *Revista de Salud Animal* 2012; 34 (1): 45-52.
34. Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomelí C, Hernández M, Sciutto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cisticercosis in Qa2 transgenic mice. *Infection and Immunity* 1998; (2): 760-764.
35. Funahashi H, Cantley T, Day B. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation *in vitro*. *Journal Reproduction and Fertility* 1994a; 101: 159-165.
36. Funahashi H, Stumpf T, Terlouw S, Cantley T, Rieke A, Day B. Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1994b, 41:1425-1433.
37. Funahashi H, Kim N, Stumpf T, Cantley T, Day B. Presence of Organic Osmolytes in Maturation Medium Enhances Cytoplasmic Maturation of Porcine Oocytes. *Biology of Reproduction* 1996; 54: 1412-1419
38. Funahashi H, Day B. Advances in *in vitro* production of pig embryos. *Journal Reproduction and Fertility* 1997; 52: 271-283.
39. Funahashi H, Fujiwara T, Nagai T. Modulation of the function of boar spermatozoa via adenosine and fertilization promoting peptide receptors reduce the incidence of polyspermic penetration into porcine. *Biology of Reproduction* 2000; 63 (4): 1157-1163.

40. Funahashi H, Nagai T. Regulation of *in vitro* penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Molecular Reproduction and Development*; 2001; 58:424-431.
41. Gadea J, García-Vázquez FA. Aplicaciones de los cerdos transgénicos en biomedicina y producción animal. *Información Técnica Económica Agraria* 2010; 106 (1): 30-45.
42. Galeati G, Modena S, Lauria A y Mattioli M. Follicle somatic cells influence pig oocyte penetrability and cortical granule distribution. *Molecular Reproduction and Development* 1991; 29:40-46.
43. García E. Análisis de diferentes factores que afectan al rendimiento de la inyección intracitoplasmática (ICSI) de espermatozoides en la especie porcina (Tesis doctoral). Murcia España; Universidad de Murcia 2005.
44. Gil M. Influencia de diferentes condiciones de cocultivo sobre la fecundación y la producción *in vitro* de embriones porcinos. (Tesis doctoral). Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. España. 2001.
45. Gil M, Cuello C, Parrilla I, Vázquez J, Roca J, Martínez E. Advances in swine *in vitro* embryo production technologies. *Reproduction in Domestic Animals* 2010; 45 Suppl 2: 40-8.
46. Gonzales-Figueroa H, Gonzales-Molfino HM. Maturation of pig oocytes *in vitro* in a medium with pyruvate. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005; 38 (6): 869-872.
47. Jurema MW, Nogueira D. *In vitro* maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertility and Sterility*. 2006; 86 (5): 1277-1291
48. Ka H, Sawai K, Wang W-H, Im K-S, Niwa K. Amino acids in maturation media and presence of cummulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. *Biology of Reproduction* 1997; 57: 1478-1483.

49. Khor E, Lim, Lee Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003; 24(13): 2339-2349.
50. Khoushab F, Yamabhai M. Chitin Research Revisited. *Marine Drugs* 2010; 8: 1988-2012.
51. Kikuchi K, Nagai T, Motlik J, Shioya Y, Izake Y. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology* 1993; 39:593-599.
52. Kumar M. A review of chitin and chitosans applications. *Reactive and Functional Polymers* 2000; 46: 1–27.
53. Lane M, Gardner D. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biology of Reproduction* 2000; 62:16-22.
54. Lárez C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 2003. 4 (2): 91–109.
55. Majeti N. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* 2000; 46: 1-27.
56. Mármol Z, Páez G, Rincón M, Araujo K, Aiello C. Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica Universidad Rafael Urdaneta. Venezuela* 2011 1: 53–58.
57. 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.
58. Menino A, Wright, R. Development of one-cell porcine embryos in two culture systems. *Journal of Animal Science* 1982; 54: 583-588.
59. Mi F, Wu Y, Shyu S, Chao A, Lai J, Su C. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release, *Journal of Membrane Science*. 2003 212: 237–254

60. Miranda S, Lizárraga E. Is Chitosan a New Panacea ? Areas of Application, En: Complex world of polysaccharides. Editado por Desiree Nedra Karunaratne. Impreso en Croacia. Primera publicación octubre 2012: 3–46
61. Mourya V. Inamdar, N, Choudhari Y. Chitooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications. Polymer Science Series A 2011; 53-7: 583-612.
62. Mucci M, Aller J, Kaiser G, Hozbor F, Alberio R. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. Archivos de Medicina Veterinaria 2006; 38 (2): 97-104.
63. Muñoz VMA. Fertilización *in vitro* en cerdos (Tesis Maestría). Posgrado en Biología Molecular. San Luis Potosí, (SLP) México. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. 2005.
64. Muzzarelli R, Muzzarelli C. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. Advances in Polymer Science 2005; 186: 151-209.
65. Nagai T. Current status and perspectives in MIV-IVF of porcine oocytes. Theriogenology 1994; 41: 73-78.
66. Nagai T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. Theriogenology 2001; 55: 1291-1301.
67. Nagai T, Funahashi H, Yoshioka K, Kikuchi K. Up date of *in vitro* production of porcine embryos. Frontiers in bioscience 2006; 11: 2565-2573.
68. Nguyen N, Lo N, Chuang S, Jian Y, Ju J. Sonic hedgehog supplementation of oocyte and embryo culture media enhances development of IVF porcine embryos. Reproduction 2011; 142: 87-97.

69. Nguyen V, Nguyen D. Application of shrimp chitosan solution as additive and supplementing ingredient in culturing 3T3 fibroblast cells. The third international conference on the development of biomedical engineering in Vietnam. Editores Vo Van Toi, truong Quang Dang Khoa. ICDBME en Vietnam, IFMBE 2010; 27: 227-230.
70. Niwa K. Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. Journal of Reproduction and Fertility Suppl 1993; 48:49-59.
71. Pérez-Vera C, García-Mata R, Angel M, Damián M. Efecto de las importaciones de carne de porcino en el mercado mexicano 1961-2007. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias 2010; 1(2): 115-126.
72. Petters R, Reed M. Addition of taurine or hypotaurine to cultura medium improves development of one and two cell pig embryos *in vitro*. Theriogenology 1991; 35: 253.
73. Petters R, Wells K. Culture of pig embryos. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement. 1993; 48:61-73.
74. Pollard J, Plante C, Leibo S. Comparison of development of pig zygotes and embryos in simple and complex culture media. Journal of Reproduction and Fertility 1995; 103: 331- 337.
75. Prudden JF, Nishihara G, Baker L, The acceleration of wound healing with cartilage-I. Surgery Gynecology and Obstetrics 1957; 105 283–286.
76. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2013. URL <http://www.R-project.org/>.
77. Rath D, Niemann H. *In vitro* fertilization of porcine oocytes with fresh and frozenthawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. Theriogenology 1997; 47:785-793.

78. Reed M, Illera M, Petters R. *In vitro* culture of pig embryos. *Theriogenology* 1992; 37: 95-109.
79. Rodríguez-Martínez H, Pertoft H, Johansson M. Cryo-scanning electron microscopy of the porcine oviduct and immunocytochemical localization of hyaluronan in the endosalpinx. *Theriogenology* 1998; 49: 335.
80. Rodríguez GE. Producción *in vitro* de embriones caprinos: sistemas de maduración citoplasmática de ovocitos de hembras prepúberes (Tesis doctoral).Sardañola del Vallés (Barcelona) España: Universidad Autónoma de Barcelona 2001.
81. Romar R, Coy P, Campos I, Gadea J, Matás C, Ruiz S. Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on *in vitro* fertilization. *Animal Reproduction Science* 2001; 68:85-98.
82. Rouget C. Des substances amylacees dans le tissu des animaux specialement les articules (Chitine). *Comptes Rendus* 1859 48, 792-795.
83. Saacke RG. Fertilidad del toro: una opinión sobre su estado actual y perspectivas. *Taurus*. Buenos Aires. Argentina. 2003; 5 (19): 18-28.
84. Saavedra M. Estudio de la composición de los gránulos corticales y del oolema de ovocitos porcinos y bovinos madurados y fecundados *in vitro*. (Tesis Doctoral) Departamento de biología celular e histología, Facultad de Medicina. Universidad de murcia España 2009.
85. 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. *Archivos de Medicina Veterinaria* 2003; 35 (1): 119-126.
86. Sathananthan AH, Trounson AO. Ultrastructure of cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized *in vitro*. *Gamete Research* 1982; 6: 225-234.

87. Senel S, McClure S. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; 56 (10): 1467-1480.
88. Shen K, Chen M, Chan H, Jeng J, Wang Y. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47: 1864–1871.
89. Somfai T, Hirao Y. Synchronization of *In vitro* Maturation in Porcine Oocytes. *Methods in Molecular Biology* 2011; 761: 211-225.
90. Stringfellow D, Seidel S. Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. 2a. Ed. Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. 1990. Illinois, USA.
91. Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 52 (2): 105-115.
92. Valdez A. Efecto de los insecticidas diazinón y malatión durante la fertilización *in vitro* en ovocitos de cerdo (Tesis maestría). Iztapalapa (México DF) México. UAM Iztapalapa. 2007
93. Wall RJ, Hyman P, Kerr D, Pintado B, Wells K. Transgenic animal technology. *Journal of Andrology* 1997; 18: 236-239.
94. Walters EM, Graves CN. Transportation and storage effects on porcine ovaries. *Journl Animal Science* 1998; 76: 69
95. Wang W, Abeydeera L, Okuda K, Niwa K. Penetration of porcine oocytes during maturation *in vitro* by cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1994; 50:510-515.
96. Wang W, Abeydeera L, Fraser L, Niwa K. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and *in vitro* fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *Journal of Reproduction and Fertility* 1995; 104: 305-313.

97. Wright R. Successful culture *in vitro* of swine embryos to the blastocyst stage. *Journal of Animal Science* 1977; 44:854-858.
98. Wu J, Emery BR, Carrell DT. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biology of Reproduction*. 2001; 64: 375-381.
99. 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*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1992; 95: 481- 485.
100. 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.
101. Yoshioka k, Suzuki C, Tanaka A, Anas I, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemical defined medium. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 112-119.
102. Yoshioka K, Suzuki C, Itoh S, Kikuchi K, Iwamura S, Rodriguez-Martinez H. Production of piglets derived from *in vitro*-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during *in vitro* fertilization. *Biology of Reproduction* 2003; 69 (6): 2092-2099.
103. Yoshioka k, Suzuki C, Onishi A. Defined system for *In vitro* production of porcine embryos using a single basic medium. *Journal of Reproduction and Development* 2008; 54: 208-2013.
104. Youngs C, McGinnis L. *In vitro* culture of porcine embryos in Whitten's medium containing varying levels of glucose and bovine serum albumin (BSA). *Biology of Reproduction* 1990. 42: 58.

105. Zheng YS, Fiser P, Sirard MA. The use of ejaculated boar semen after freezing in 2 or 6% glycerol for *in vitro* fertilization of porcine oocytes matured *in vitro*. Theriogenology 1992; 38:1065-1075.

APÉNDICE.

Composición de medios para la producción *in vitro* de embriones.

Solución Salina

Utilizada para el transporte y lavado de los ovarios.

Composición: 0,9% (p/v) de NaCl. Osmolaridad 320 mOsm.

Medio TL-HEPES-PVA.

Para el lavado de los complejos ovocito-células del cúmulo (Ducolomb *et al.*, 2009).

Cuadro A. Medio TL-HEPES-PVA.

	mM
NaCl	114
KCl	3.2
NaH ₂ PO ₄	0.34
Lactato de Sodio	10
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.50
HEPES	10
Piruvato de Sodio	0.20
Sorbitol	12
NaHCO ₃	20
PVA	0.1
*CaCl ₂ .2H ₂ O	2
Gentamicina	25µg/ml

*Añadir al final.

Ajustar pH a 7.3 – 7.4

Esterilizar por filtración con membranas de 0.22 µm.

Almacenar a 4°C y utilizar en un periodo de 2 a 3 semanas.

Medio de maduración *in vitro* (MIV).

El medio de maduración comercial se debe suplementar con los ingredientes que se muestran en el cuadro B antes de colocarlo para equilibrarse en la incubadora y posteriormente ya con los complejos ovocito-células del cúmulo se suplementa con hormonas LH 0.5 µg/ml y FSH 0.5 µg/ml.

Cuadro B. Suplementos para el medio de maduración: Medio de Cultivo de Tejidos 199 con sales de Earle, bicarbonato y L-glutamina (IN VITRO, México) Ducolomb *et al.*, 2005.

Ingrediente	mM
Alcohol Polivinílico PVA	0.1%
D- Glucosa	3.05
Piruvato de sodio	0.91
Cisteína	0.57
EGF	10 ng/ml
Estreptomicina	0.05 mg/ml
Penicilina	0.075 mg/ml

Esterilizar por filtración con membranas de 0.22 µm.

Almacenar a 4°C y utilizar en periodo de 1 semana.

Medio de fertilización *in vitro* (FIV).

Cuadro C. Medio designado como Tris-buffer modificado (mTBM) (Ducolomb *et al.*, 2005).

Ingrediente	Mm
NaCl	113.10
KCl	3
CaCl ₂ .2H ₂ O	7.5
Tris (base libre)	20
Glucosa	11
Piruvato de Na	5
Cafeína	2.5
BSA	0.4%

Esterilizar por filtración con membranas de 0.22 µm.

Almacenar a 4°C y utilizar en periodo de 1 semana.

Incubar 24 h antes de la FIV.

Medio de desarrollo embrionario.

Cuadro D. Medio NCSU- 23 (Petters y Wells, 1993).

	Mm
NaCl	108.73
KCl	4.78
KH ₂ PO ₄	1.19
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.19
D-glucosa	5.55
Glutamina	1.00
Taurina	7.00
Hipotaurina	5.00
NaHCO ₃	25.07
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.70
Penicilina G	75 µg/mL
Estreptomicina	50 µg/mL

Ajustar pH a 7.2 – 7.3.

Esterilizar por filtración con membranas de 0.22 µm.

Almacenar a 4°C y utilizar en periodo de 2 a 3 semanas.